

# **A Salmonella Genomic Island 1 és az IncA/C plazmidok molekuláris kapcsolatainak vizsgálata *E. coli* modellrendszerben**

Doktori értekezés

**Murányi Gábor**

Témavezető: **Dr. Kiss János**, tudományos főmunkatárs

Nemzeti Agrárkutatási és Innovációs Központ,  
Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóintézet, Genetikai főosztály,  
Gazda-patogén interakció és mikrobiális genomika csoport, Gödöllő



Biológia Doktori Iskola

Iskolavezető: Dr. Erdei Anna, egyetemi tanár, az MTA tagja

Klasszikus és Molekuláris Genetika Doktori Program

Programvezető: Dr. Vellai Tibor, egyetemi tanár

Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar, Budapest



**2020**

# TARTALOMJEGYZÉK

Rövidítésjegyzék .....	4
<b>I. Irodalmi áttekintés.....</b>	<b>7</b>
<b>1. Mobilis genetikai elemek .....</b>	<b>7</b>
<b>1.1 Intracelluláris mobilis genetikai elemek .....</b>	<b>7</b>
1.1.1 Integronok.....	7
1.1.2 Transzpozábilis elemek: IS elemek és transzpozonok .....	9
<b>1.2. Intercelluláris mobilis genetikai elemek .....</b>	<b>12</b>
1.2.1 Konjugatív plazmidok.....	12
1.2.2 Bakteriofágok .....	16
1.2.3 Genomi szigetek.....	19
1.2.3.1 Integratív és konjugatív elemek .....	19
1.2.3.2 Integratív mobilizálható elemek .....	22
<b>2. A Salmonella Genomic Island 1 és az IncA/C plazmidok kapcsolata .....</b>	<b>24</b>
2.1. Salmonella Genomic Island 1 .....	24
2.2. IncA/C plazmidok.....	26
2.3. Az SGI1 mobilizációja .....	28
2.4. Az IncA/C plazmidok mesterregulátora: az FlhDC homológ AcaCD.....	29
2.5. Az SGI1 és az IncA/C plazmidok stabilitását biztosító rendszerek .....	30
2.5.1. Partíciós rendszerek.....	30
2.5.2. Toxin-antitoxin rendszerek .....	31
2.5.3. Entry exclusion .....	32
2.6. Kutatási előzmények.....	33
<b>II. Célkitűzések.....</b>	<b>34</b>
<b>III. Anyagok és módszerek .....</b>	<b>35</b>
1. Baktérium törzsek, tápoldatok, antibiotikumok, enzimek és vegyszerek .....	35
2. DNS emésztés restrikciós endonukleázokkal .....	35
3. Plazmid konstrukciók .....	35
4. Polimeráz láncreakció (PCR) és primerek.....	36
5. Elektrokompétens sejtek készítése egy lépéses géninaktivációhoz, elektroporáció .....	36
6. Egy lépéses géninaktiváció.....	37
7. Konjugációs tesztek.....	39
8. Fehérje expresszió vizsgálata (SDS PAGE) .....	40

9. Növekedési görbe felvétele.....	40
10. $\beta$ -galaktozidáz mérések.....	40
11. Primer extenziós analízis.....	41
12. Plazmid stabilitási vizsgálatok.....	42
IV. Eredmények.....	44
1. SGI1 mutánsok kivágódásának és transzferének vizsgálata.....	44
2. Az SGI1 AcaCD-függő mobilizációja .....	48
3. Az AcaCD homológ SGI1 mesterregulátor azonosítása .....	49
4. Az FlhDC <sub>SGI1</sub> komplementálja a R16a <i>acaCD</i> delécióját .....	53
5. Az SGI1 <i>acaCD</i> -reszponzív promótereinek vizsgálata .....	54
6. Transzkripció starthelyek meghatározása .....	56
7. Az S004 negatív hatása a baktérium növekedésére.....	57
8. Az SGI1 és IncA/C plazmidok között fennálló inkompatibilitás vizsgálata .....	59
8.1 Az R55 stabilitásának vizsgálata SGI1 deléciós mutánsok jelenlétében .....	60
8.2 Az FlhDC <sub>SGI1</sub> szerepének vizsgálata az IncA/C plazmidok stabilitásában .....	63
8.3 Az R55 stabilitásának vizsgálata SGI1 fragmenteket hordozó plazmidokkal ...	65
8.4 A S013-S014 operon promóter régiójának vizsgálata .....	68
8.5 A S013 és S014 fehérjék szerepének vizsgálata.....	69
8.6 A S014 és S015 közötti nem kódoló régió vizsgálata .....	71
V. Diszkusszió .....	73
1. A SGI1 kivágódásának és konjugatív transzferének feltételei.....	73
2. Az SGI1-IncA/C rendszer FlhDC-homológ mesterregulátorainak vizsgálata .....	74
3. Az SGI1 és IncA/C plazmidok inkompatibilitásának vizsgálata .....	77
VI. Összefoglalás.....	82
VII. Summary .....	83
VIII. Irodalomjegyzék .....	84
X. Köszönetnyilvánítás.....	94
XI. Mellékletek .....	95
Melléklet 1: 8. táblázat Baktérium törzsek listája.....	95
Melléklet 2: 9. táblázat Plazmidok listája .....	96
Melléklet 3: Plazmidok részletes leírása .....	99
Melléklet 4: 10. táblázat Primerek listája .....	101

## Rövidítésjegyzék

ACSSuT fenotípus: multirezisztens fenotípus ampicillin, kloramfenikol, streptomycin/spektinomycin, szulfonamid és tetraciklin antibiotikumokra

[antibiotikum]R: [antibiotikum] rezisztens

Ap: ampicillin

ARI: antibiotikum rezisztencia sziget (*antibiotic resistance island*)

ATPáz: adenosin-trifoszfátáz

*att*: attachment site, fág, ICE, IME kromoszomális integrációs helye

bp: bázispár

CBP: centromer szekvenciát kötő fehérje (*centromere binding protein*)

CFU: telepkepző egység (*colony forming unit*)

Cm: kloramfenikol

CTn: konjugatív transzpozon (*conjugative transposon*)

C1 integron: I. osztályú integron (*class I integron*)

dNTP: dezoxi-nukleotid-trifoszfát

DR: direkt ismétlődő szekvencia (*direct repeat*)

Eex: belépési kizáródás (*entry exclusion*)

gDNS: genomi DNS

GI: genomi sziget (*genomic island*)

Gm: gentamycin

HGT: horizontális géntranszfer (*horizontal gene transfer*)

ICE: integratív és konjugatív elem (*integrative and conjugative element*)

IME: integratív és mobilizálható elem (*integrative and mobilizable element*)

Inc: inkompatibilitási csoport

Int: integráz (*integrase*)

IntI: integron integráz (*integron integrase*)

IR: inverz ismétlődő szekvencia (*inverted repeat*)

IS: inszerciós szekvencia (*insertion sequence*)

kb: kilobázis

Km: kanamycin

KO: génkiütő/ütött (*knock-out*)

LA: LB agar

LB: Luria tápoldat (*Luria broth*)

MCS: plazmidok több hasítóhelyet tartalmazó klónozó régiója (*multicloning site*)

MDR: multidrog rezisztencia

MGE: mobilis genetikai elem (*mobile genetic element*)

MPF: párosodási formáció (*mating pair formation*)

Mw: molekulásúly marker

Nal: nalidixinsav

NTP: nukleotid-trifoszfát

NTPáz: nukleozid-trifoszfátáz

*oriT*: transzfer origó (*origin of transfer*)

*oriV*: replikációs origó (*origin of replication*)

Par: partíciós funkció (*partition*)

*par* hely: partíciós hely (*partition site*)

P<sub>c</sub>: az *intI* szekvenciájában elhelyezkedő promóter

P<sub>gén</sub>: alsó indexált gén promótere

PCR: polimeráz láncreakció

PSK: posztszegregációs elimináció (*post segregational killing*)

RAF: relaxoszóma járulékos faktorai (*relaxosome accessory factors*)

RDF: rekombináció irányát meghatározó faktor (*recombination directionality factor*)

RTn: retrotranszpozon (*retrotransposon*)

SD: Shine-Dalgarno

SDS: dodecil-szulfát nátrium só

SgiAT: az S026-S025 operon által kódolt toxin-antitoxin rendszer

SGI1: Salmonella Genomic Island 1

Sm: streptomycin

Sp: spektinomycin

*S. Typhimurium*: *Salmonella enterica* Typhimurium szerovariáns (*Salmonella enterica* serovar Typhimurium)

TA: toxin-antitoxin

Tc: tetraciklin

Tn: transzpozon (*transposon*)

TSS: transzkripció kezdőpontja (*transcription start site*)

TPáz: transzpozáz (*transposase*)

*tra*: transzfer gének

Tra: transzfer fehérjék

T4CP: T4SS-hez kapcsolódó „*coupling*” fehérje (*type IV coupling protein*)

T3SS: 3-as típusú szekréciós rendszer (*type III secretion system*)

T4SS: 4-es típusú szekréciós rendszer (*type IV secretion system*)

Xis: excizionáz (*excisionase*), rekombináció irányát meghatározó faktor

PAI: patogenitási sziget (*pathogenicity island*)

PAGE: poliakrilamid gélelektroforézis

ON: éjszakán át (*overnight*)

ORF: nyitott leolvasási keret (*open reading frame*)

EDTA: etilén-diamin-tetraecetsav

TAE: Tris-acetát-EDTA puffer

wt: vad típus (*wild type*)

3'-CS: 3' konzervált szegment (*3' conserved segment*)

5'-CS: 5' konzervált szegment (*5' conserved segment*)

# I. Irodalmi áttekintés

## 1. Mobilis genetikai elemek

A horizontális géntranszfer (*horizontal gene transfer*, HGT) a baktériumok adaptív evolúciójának egyik meghatározó hajtóereje. A HGT gyakran olyan esemény, amely különböző mobilis genetikai elemek (*mobile genetic element*, MGE) akár rokonságban nem álló organizmusok közötti mozgásához köthető. A prokarióták genomjának szerves részei a bakteriális kromoszómára integrálódott és az extrakromoszomális MGE-k (Bellanger és mtsai, 2014).

A MGE-ket elsősorban a DNS transzfer lokalizációja alapján lehet csoportosítani: az intracelluláris MGE-k elsősorban a sejt genomján belül képesek helyet változtatni, míg az intercelluláris MGE-k baktériumsejtek genomjai között tudnak terjedni (Frost és mtsai, 2005).

Az intracelluláris MGE-k olyan DNS szegmentek, amelyek a mobilizációhoz szükséges fehérjét és gyakran más fehérjéket is kódolnak (Frost és mtsai, 2005). Ilyen DNS szegmentek többek között az integronok és a transzpozázilis elemek: az inszerciós szekvenciák (*insertion sequence*, IS) és a transzpozonok (*transposon*, Tn).

Az intercelluláris MGE-k csoportjába tartoznak a konjugatív plazmidok, a mobilizálható plazmidok, a bakteriofágok, illetve a genomi szigetek (*genomic island*, GI) közül az integratív és konjugatív elemek (*integrative and conjugative element*, ICE) és az integratív és mobilizálható elemek (*integrative and mobilizable element*, IME) csoportjai (Frost és mtsai, 2005; Bellanger és mtsai, 2014).

### 1.1 Intracelluláris mobilis genetikai elemek

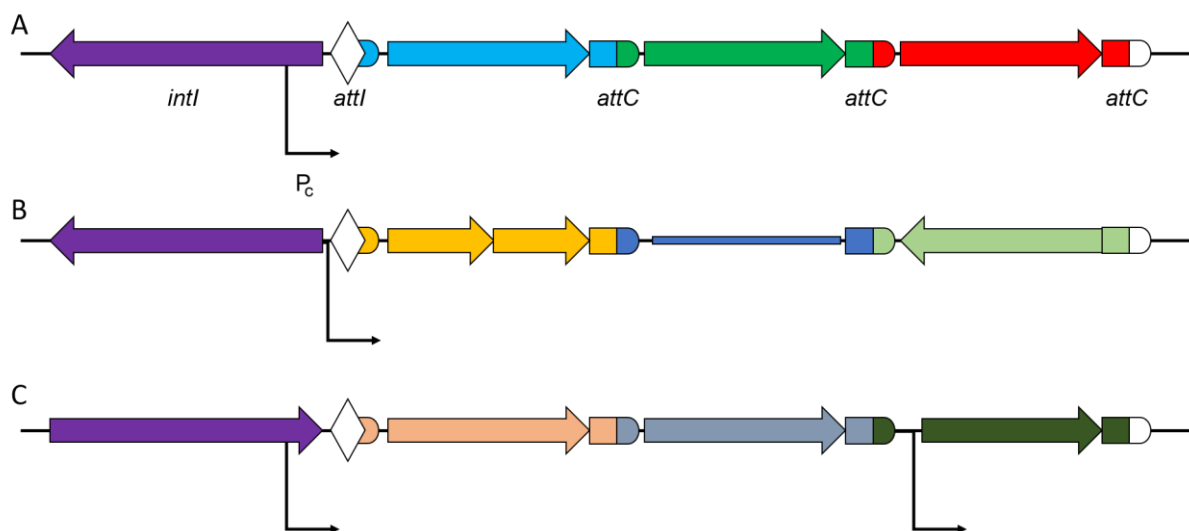
#### 1.1.1 Integronok

Az integronok általános alkotóelemei a bakteriális genomoknak, „génelfogó” rendszereknek is nevezik őket (Jackson és mtsai, 2011). Bakteriális genomszekvenciák bioinformatikai analízise alapján az eddig szekvenált genomok megközelítőleg 10-17%-ában találtak integronokat vagy integrázt kódoló gént (Domingues és mtsai, 2012). Az integronok általánosan hozzájárulnak a baktériumok új környezeti körülményekhez való adaptációjához, illetve részt vesznek a bakteriális genom evolúciójában új génkombinációk kialakítása által (Gillings, 2014).

Az integronokat genomi helyzetük alapján csoportosították: egy részüket a bakteriális kromoszómák (kromoszomális integronok), míg más részüket az MGE-k hordozzák (mobilis integronok). A mobilis integronoknak fontos szerepük van az antibiotikum rezisztenciák HGT-vel való terjedésében (Domingues és mtsai, 2012; Gillings, 2014).

Az integronok (1. ábra) általános felépítése három részre tagolható: az integrálódott variábilis génkazettákat az 5', illetve a 3' konzervált szegment (5'/3' *conserved segment*, 5'/3'-CS) veszi körbe. A cirkuláris génkazetták helyspecifikus rekombinációja a génkazetták *attC* és az integron *attI* helye között történik, amelyet az integron által kódolt integron integráz (*integron integrase*, IntI) katalizál. A helyspecifikus rekombinációval beépült kazetták az *intI*-től *downstream* helyezkednek el, így a génkazetták expresszióját az *intI*-ben vagy az *intI* közelében elhelyezkedő promóter ( $P_c$ ) biztosítja. A beépült génkazetták rendelkezhetnek saját promóterrel is. Az *intI* és a beépült génkazetták szerveződése változatos lehet (1A-C ábra) (Gillings, 2014).

Több génkazetta egymás utáni ismételt beépülése során mindig a legutóbb érkező génkazetta lesz *upstream* pozícióban a már meglévőkhöz képest. A génkazettákat az egyes kazetták *attC* helyei határolják (Gillings, 2014).



**1. ábra Az integronok általános struktúrái.**

A) Az *intI* kódolja az integron integrázt (lila), melynek orientációja a génkazettákkal általában ellentétes, a  $P_c$  az *intI* szekvenciájában elhelyezkedő promóter (irányultságát és helyét fekete nyíl jelöli). Az *attI* az integron rekombinációs helye (fehér rombusz). Az *attC* helyek a génkazetták és az integron rekombinációjából származtatható helyek az egyes génkazetták között, amelyeket különböző színekkel kitöltött nyilak jelölnek. B) A  $P_c$  elhelyezkedhet az *intI* és *attI* között is. Az integronok hordozhatnak két ORF-ot kódoló kazettát (sárga), illetve ORF nélküli kazettát (sötétkék téglalap) is. Egyes kazetták orientációja ellentétes lehet a többi kazettáéval (világoszöld). C) A génkazettáknak lehet saját promótere is (sötétzöld) (Gillings, 2014 nyomán).



Az integronokat az általuk kódolt integron integráz alapján négy csoportba sorolták, melyek közül a legtöbb figyelmet az I., II. és III. osztályú integronok kapták (Domingues és mtsai, 2012; Deng és mtsai, 2015).

Az I. osztályú (*class I*, C1) integronok megtalálhatók Gram<sup>-</sup> és Gram<sup>+</sup> baktériumokban, azonban a C1 integronok nagyobb hányadát a Gram<sup>-</sup> baktériumokban írták le, pl. *Acinetobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella* és *Vibrio*. A C1 integronok emellett számos MGE-ben megtalálhatók. C1 integronokat azonosítottak már többek között Tn6001-ben (*Pseudomonas aeruginosa*) az integratív és konjugatív SXT elemekben (*Vibrio cholerae*), IncI1 (*Klebsiella pneumoniae*) és IncHI2 (*Enterobacter cloacae*) plazmidokban (Domingues és mtsai, 2012).

A C1 integronok az általános felépítésnek megfelelően három régióra oszthatók: 5'-CS, 3'-CS, és az elfogott génkazettákat hordozó variábilis régió. Az 5'-CS-t az *intI1*, a rekombinációs hely *attI* és a P<sub>c</sub> promóter, míg a 3'-CS-t a *qacEΔ1*, amely egy hiányos rezisztenciagén, a *sulI* gén, amely szulfonamid rezisztenciát kódol, illetve egy ismeretlen funkciójú *orf5* alkotja (Domingues és mtsai, 2012).

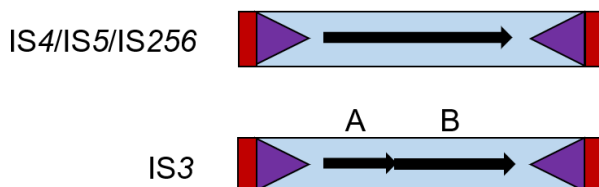
A II. osztályú integronok szerveződése hasonló a C1 integronokéhoz, a kazetták integrációját az IntI2 típusú integráz biztosítja, illetve a 3'-CS-ben öt transzpozon gén helyezkedik el (*tnsA-E*). A III. osztályú integronok szintén a C1 integronokhoz hasonlóak, a kazetták integrációját az IntI3 integráz bonyolítja (Deng és mtsai, 2015).

Emellett megemlítenéd a IV. osztályú integronok is: az első IV. osztályú integront elsőként *Vibrio cholerae*-ben azonosították: 179 génkazettát (216 gént) hordozott, amely a baktérium genomjának megközelítőleg 3%-át foglalta magába (Deng és mtsai, 2015).

### 1.1.2 Transzpozábilis elemek: IS elemek és transzpozonok

Az IS elemek (2. ábra) általában egy transzpozázt (*transposase*, TPáz) kódoló nyitott leolvasási keretet (*open reading frame*, ORF) tartalmaznak, amely az IS elem transzpozíciójához szükséges. Az IS elemeket rövid inverz ismétlődő szekvenciák (*inverted repeat*, IR) határolják, amelyeket a TPáz képes felismerni a transzpozíció során. A TPáz-t egy ORF (pl. IS4, IS5, IS6, IS10, IS701) vagy két +1/-1 kereteltolódással (*frameshift*) illeszkedő ORF kódolja (pl. IS1, IS3). Az IS3 családnál a TPáz-a mellett a *frameshift* kimaradásával gyakran egy csonka szabályozó fehérje is transzlálódik, ami a TPáz N-terminálisán lévő DNS-kötő domént tartalmazza csupán. A legtöbb IS elem integrációja direkt ismétlődő szekvenciákat (*direct repeat*, DR) generál az integráció helyén (Jackson és mtsai, 2011; Siguier és mtsai, 2015), de

vannak olyan IS elemek is, amelyeket nem határolnak IR szekvenciák, illetve DR szekvenciát sem generálnak (pl. IS91, IS200/IS604, IS607 család). Vannak családok, amelyek hordozhatnak további ORF-okat, melyek szükségesek a hatékony transzpozícióhoz (pl. IS66 három ORF-ot kódol, melyből a harmadik a TnpC). Napjainkig több, mint 4000 különböző IS elemet azonosítottak (Siguier és mtsai, 2015).



## 2. ábra Az IS elemek általános struktúrája.

Az IS elemek szerveződése: IS4/IS5/IS256 – tipikus IS elemek egy transzpozáz génnel. IS3 – az IS elem TPáz-t kódoló génjének két leolvasási kerete van (A és B) és a TPáz teljes expressziójához kereteltolódásra (*frameshifting*) van szükség. Az ORF-okat fekete nyilak, az IS elemeket határoló IR szekvenciákat lila háromszögek, a DR szekvenciákat bordó téglalapok jelölik (Siguier és mtsai nyomán 2015).

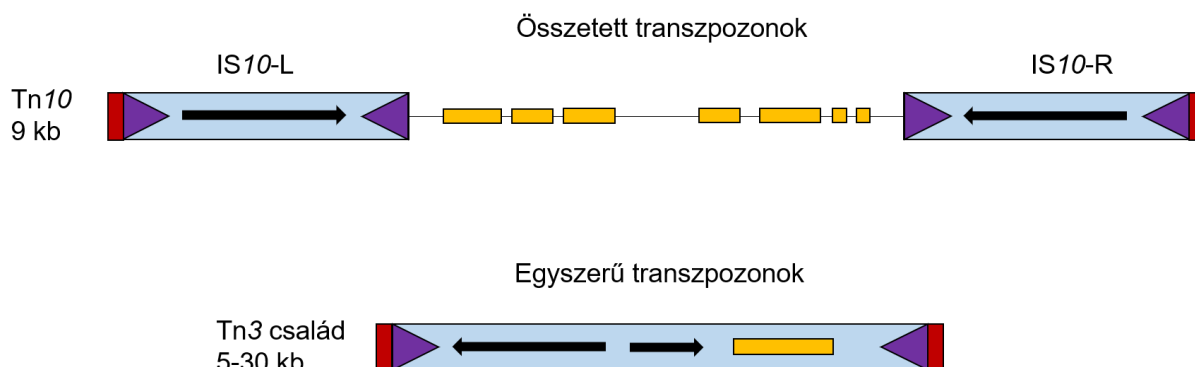
Az IS elemek mozgása különböző genomi átrendeződéseket eredményezhet, mint pl. inszerció, delécio, inverzió vagy replikon fúzió. Mobilis elemekre (plazmidok, genomi szigetek, bakteriofágok) való transzpozíciójuk elősegítheti bizonyos génklaszterek mobilizálását, sőt esetenként létrehozását, így virulencia kialakulása vagy akár anyagcsere útvonalak szerveződése is megtörténhet áthelyeződésük révén. Az új génkombinációk létrehozásával a bakteriális kromoszómán vagy plazmidokon fontos szerepet játszanak a gazdabaktériumok adaptációjában és gyors evolúciójában (Mahillon és mtsai, 1999).

A transzpozonok két nagy csoportba sorolhatók: retrotranspozonok/egyéb retroelemek (*retrotransposon*, RTn) és DNS Tn-ok. A RTn-ok és egyéb retroelemek általában eukarióta szervezetekben fordulnak elő, míg a DNS Tn-ok eukariótákban és prokariótákban elterjedtek (Babakhani és Oloomi, 2018).

A bakteriális Tn-ok (3. ábra) komplexebb felépítésűek az IS elemeknél, egyszerű (*unit*) vagy összetett (*composite*) Tn-ok lehetnek (Babakhani és Oloomi, 2018). Az egyszerű Tn-okat (pl. a Tn3 család elemeit) IR szekvenciák, míg az összetett transzpozonokat rendszerint IS elemek határolják, mint pl. Tn5 esetében IS50-L és IS50-R. A Tn-ok általában saját TPáz-ukon kívül további géneket is hordoznak, pl. virulenciagéneket vagy antibiotikum rezisztenciát kódoló géneket (Jackson és mtsai, 2011; Babakhani és Oloomi, 2018).

A bakteriális Tn-ok a DNS Tn-ok közé tartoznak (Babakhani és Oloomi, 2018), a II-es típusú intronok kivételével, amelyeket a retroelemek közé sorolnak (Robart és Zimmerly,

2005). A Tn-ok plazmidról plazmidra, plazmidról kromoszómára és kromoszómáról plazmidra is képesek áthelyeződni (Babakhani és Oloomi, 2018).



### 3. ábra Az összetett és egyszerű transzpozonok általános stuktúrája.

Tn10 – összetett transzpozon, amelyet két IS10 elem határol (IS10-L és IS10-R). Tn3 – egyszerű transzpozon, amelyet DR és IR szekvenciák határolnak. Az ORF-okat fekete nyilak, az IR szekvenciákat lila háromszögek, a DR szekvenciákat sötétvörös téglalapok, a járulékos géneket sárga téglalapok jelölik (Siguier és mtsai nyomán 2015).

Az IS elemek és Tn-ok TPáz-ai a fehérje katalitikus helyének aminosavai alapján csoportosíthatók, így megkülönböztetünk DDE (ennek egy válfaja a DEDD) (D: aszparagin, E: glutamin), HUH (H: hisztidin, U: hidrofób aminosav), tirozin (Y) és szerin (S) TPáz-okat. A bakteriális IS elemek és DNS Tn-ok TPáz-ainak jelentős hányada a DDE transzpozázok közé tartozik (Nesmelova és Hackett, 2010; Vandecraen és mtsai, 2017).

A DDE TPáz-ok három központi aminosava a katalízishez szükséges fémionok (pl.  $Mg^{2+}$  vagy  $Mn^{2+}$ ) koordinációját segíti. A transzpozíció a foszfodiészter kötések elhasításával kezdődik az IR szekvenciák végeinél, ami szabad 3'-OH csoportok kialakulásához vezet. A szabad 3'-OH végeket a TPáz mindaddig védi, amíg nem kötődik a cél DNS-hez egy transzészterifikációs reakcióban, amelyet szintén a TPáz katalizál (Nesmelova és Hackett, 2010).

Említésre érdemes, hogy a transzpozábilis Mu bakteriofágot rendszerint a Tn-ok közé sorolják. A Mu bakteriofág egy DDE TPáz-t kódol, amely rokon más transzpozázokkal, illetve retrovirális integrázokkal (Rice és Kiyoshi, 1995). A fágot *attachment* (*att*) helyek határolják (*attR* és *attL*), amelyeket a TPáz ismer fel (Babakhani és Oloomi, 2018). A fág replikációja lényegében sokszoros replikatív transzpozíció eredménye.

## 1.2. Intercelluláris mobilis genetikai elemek

### 1.2.1 Konjugatív plazmidok

A plazmidok általánosan cirkuláris vagy lineáris, extrakromoszomális replikonok, amelyek a *Bacteria*, *Archaea* és *Eukarya* doméneken belül egyaránt elterjedt MGE-knek tekinthetők (Shintani és mtsai, 2015). A plazmidok mérete néhány kilobázistól 2 megabázisig terjedhet és a teljes genom akár 45%-át is alkothatják (Bañuelos-Vazquez és mtsai, 2017).

A plazmidok (4. ábra) konzervált gerince általában olyan funkciókat kódol, amelyek a plazmid replikációjához, stabil fenntartásához és konjugatív plazmidok esetében a plazmid mobilitásához szükségesek (Guynet és mtsai, 2011; Orlek és mtsai, 2017).

A replikációs rendszert rendszerint egy plazmid által kódolt Rep iniciátor fehérje és a replikációs origó (*origin of replication*, *oriV*) alkotja, azonban egyéb járulékos fehérjék (pl. DnaA) és kötőhelyek (*dnaA box*, amely a DnaA kötőhelyéül szolgál) is közreműködhetnek a replikáció megindításában. A replikáció szabályozásában részt vehetnek antiszensz RNS-ek, rövid DNS szekvenciák (iteronok), és további szabályozó fehérjék is. Például számos esetben az *oriV* régió olyan DR szekvenciákat (iteronokat) hordoz, amelyek a Rep iniciátor fehérje kötőhelyéül szolgálnak és ezáltal szabályozó funkciókat is ellátnak. Ezek a *cis*-elemek általában a plazmidok kópiaszámát szabályozzák. A plazmid replikációs rendszer működésének és a kópiaszám megfelelő szabályozásának fontos szerepe van a plazmid stabil fennmaradásában (del Solar és mtsai, 1998).

A magas kópiaszámú plazmidok általában diffúzióval kerülnek a leánysejtekbe a sejt-osztódás során. A nagyméretű, alacsony kópiaszámú plazmidok stabil fennmaradását ezzel szemben rendszerint egy vagy több, a plazmid által kódolt partíciós (*partition*, Par) rendszer biztosítja (Brooks és Hwang, 2017).

Amikor két különböző plazmidot nem lehetséges együttesen fenntartani egyazon baktériumtörzsben, a két plazmid inkompatibilis egymással. A plazmidokat különböző inkompatibilitási (Inc) csoportokba sorolják replikációs és Par rendszerük alapján (Shintani és Nojiri, 2013), a fennálló inkompatibilitás rendszerint fenntartó rendszereik interferálódásából fakad (Humbert és mtsai, 2019). Az *Enterobacteriaceae* csoporton belül eddig 27 Inc csoportot írtak le (Shintani és Nojiri, 2013).

A plazmidok stabilitásához a toxin-antitoxin (TA) rendszerek is hozzájárulnak. A TA rendszerek a plazmidot nem hordozó leánysejt sejthalálát vagy a leánysejt növekedésének

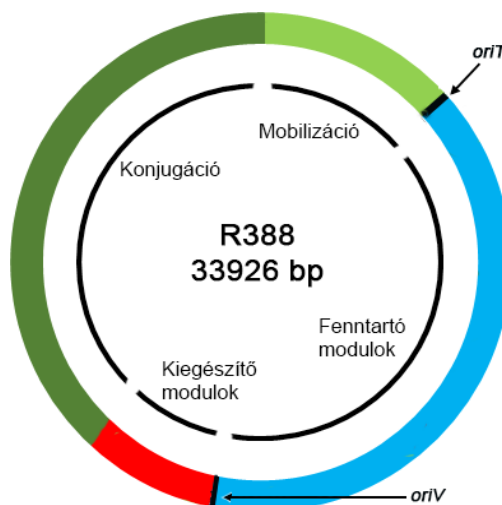
gátlását okozzák. Ezt a jelenséget poszt-szegregációs eliminációnak is nevezik (*post-segregational killing*, PSK) (Hernández-Arriaga és mtsai, 2014).

A rokon plazmidok a konzervált gerinc mellett különböző kiegészítő modulokat hordozhatnak a gazdabaktérium számára előnyös tulajdonságokkal, mint az antibiotikum vagy nehézfém rezisztencia gének, patogenitáshoz szükséges gének vagy olyan génklaszterek, amelyek képessé teszik a baktériumokat a speciális környezeti körülményekhez való alkalmazkodásra (Guynet és mtsai, 2011; Jackson és mtsai, 2011; Bañuelos-Vazquez és mtsai, 2017; Guédon és mtsai, 2017; Orlek és mtsai, 2017). Az IncP-1 csoportba tartozó plazmidok közül a pJP4 a 2,4-diklór-fenoxi-ecetsav és 3-klór benzoát degradációt segíti *Cupriavidus necator*-ban, a pADP-1 az atrazin degradációt segíti *Pseudomonas*-ban, a pEST4011 a 2,4-diklór-fenoxi-ecetsav katabolizmusát segíti *Achromobacter xylosoxidans*-ban, a pIJB1 a 2,4-diklór-fenoxi-ecetsav és malonsav katabolizmusában vesz részt *Burkholderia cepacia*-ban (Heuer és Smalla, 2012).

A konjugatív plazmidok esetében a plazmid méretének jelentős hányadát képezheti a mobilitásához szükséges régió. A konjugatív plazmidok lehetnek önmagukban konjugatívok (pl. R388) (Guynet és mtsai, 2011), de ismertek úgynevezett mobilizálható plazmidok (pl. pSymB), melyek csak a mobilizációhoz szükséges régiót hordozzák, azaz a transzfer origót (*origin of transfer*, *oriT*) és ennek felismerését végző fehérjéket (pl. relaxáz) kódoló ORF-okat, de nem hordozzák a konjugációhoz ugyancsak nélkülözhetetlen T4SS szekréciós rendszert (Smillie és mtsai, 2010; Ramsay és mtsai, 2016). Smillie és mtsai szekvencia analízis alapján megállapították, hogy a prokarióták vizsgált plazmidjainak 15%-a volt konjugatív, illetve 24%-a volt mobilizálható, míg a plazmidok 61%-a nem képes konjugatív transzferrel terjedni. A *Proteobacteria* kládon belül a plazmidok megoszlása számottevően nem különbözik: 28%-uk konjugatív, 23%-uk mobilizálható, 49%-uk nem transzferábilis (Smillie és mtsai, 2010). A legkisebb ismert, feltételezhetően konjugatív plazmidot, a 21,8 kilobázis (kb) hosszú pCRY-t *Yersinia pestis*-ben azonosították (Smillie és mtsai, 2010). A legnagyobb konjugatív vagy mobilizálható plazmidokat *Sinorhizobium meliloti* 1021-ben találták: a pSymA plazmid 1,35 Mb méretű, míg a pSymB mobilizálható plazmid 1,68 Mb méretű (Smillie és mtsai, 2010).

A 4-es típusú szekréciós rendszer (*type IV secretion system*, T4SS) széleskörben elterjedt Gram<sup>-</sup> és Gram<sup>+</sup> baktériumokban. A T4SS alapvetően fehérjék szekrécióját végzi (pl. monomer fehérjék, toxin fehérjék és a nukleoporin komplex fehérjéi) (Fronzes és mtsai, 2009), de ez a multiprotein komplex segíti más makromolekulák (DNS szubsztrátok, fehérje-DNS komplexek) átjutását is a donor sejtől a recipiensbe (Wallden és mtsai, 2010; Christie,

2016), melyhez közeli sejt-sejt kapcsolat szükséges a donor és a recipiens sejtek között (Burrus és Waldor, 2004).



**4. ábra A fenntartó és kiegészítő modulok általános szerveződése az R388 konjugatív plazmid példáján keresztül.**

A konzervált gerinc magába foglalja a fenntartó modulokat (kék) (replikációban, stabilitásban, a transzkripció szabályozásban résztvevő és ismeretlen funkciójú gének), a mobilizációban (világoszöld) és konjugációban (sötétzöld) résztvevő modulokat. A kiegészítő modulokat (pl. integron gének) piros jelöli. Az *oriT* és *oriV* régiókat fekete nyilak jelölik (Guynet és mtsai, 2011 alapján).

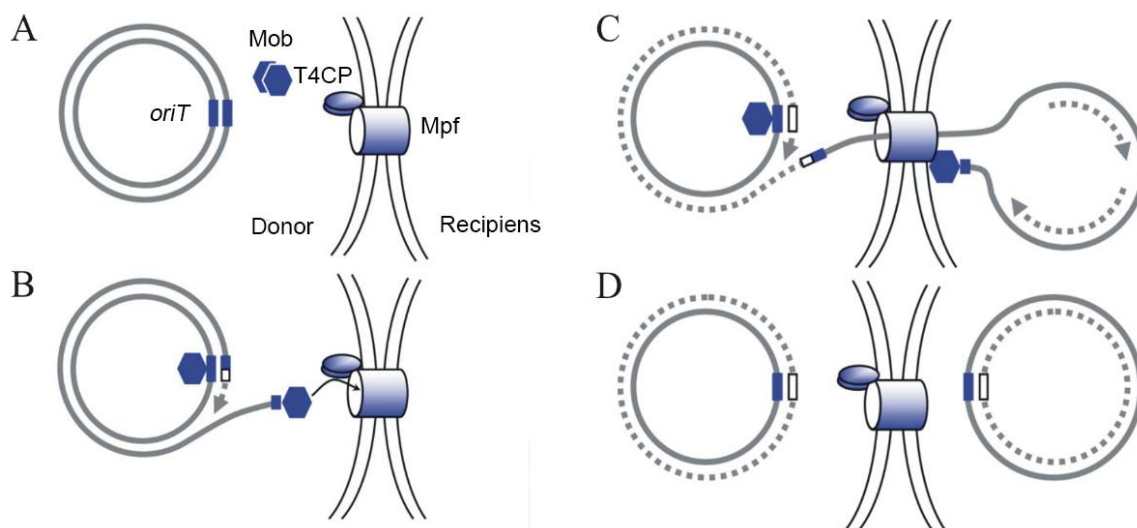
A transzport folyamatát bonyolító T4SS-t Gram<sup>-</sup> baktériumokban három fő egység alkotja: egy belső membránhoz asszociált komplex, egy külső komplex és maga a (szex) *pilus*. Gram<sup>+</sup> baktériumok esetében a külső komplex és a *pilus* hiányzik (Bellanger és mtsai, 2014; Guédon és mtsai, 2017). A belső membránhoz asszociált komplexet általában a VirB4 és VirB11 ATPázok, illetve VirB3, VirB5, VirB6, VirB8 fehérjék, a külső komplexet a membránhoz asszociált VirB7 és VirB9, illetve a VirB10 fehérjék, a *pilus*-t a VirB1, VirB2 és VirB5 fehérjék alkotják, amelyek megfeleltethetők a különböző mobilis elemek transzfer génei (*transfer*, *tra* gének) által kódolt fehérjékkel (*transfer*, Tra fehérjék), azonban a Tra fehérjék elnevezése és genomi szerveződése csoportonként rendkívül változatos (pl. P-típusú T4SS-ek esetén a VirB1 fehérje R388-ban TraN, míg pKM101-ben TraL elnevezést kapott) (Christie, 2016).

A DNS transzportban további VirD4 T4SS-hez kapcsolódó „*coupling*” fehérjék (*type IV coupling protein*, T4CP) vesznek részt, amelyek a szubsztrátok felismerését végzik (szubsztrát receptorok), illetve a DNS szubsztrátok számára dokkolóhelyként szolgálnak (Christie, 2016).

A konjugáció folyamatát az alábbiak szerint lehet röviden összefoglalni az F plazmid példáján keresztül, mely az egyik legalaposabban tanulmányozott konjugatív plazmid (5. áb-

ra) (Bellanger és mtsai, 2014). Elsőként a plazmidot hordozó donorsejt kapcsolódik a recipiens sejthez a T4SS-hez tartozó *pilus* és adhezinek segítségével (Bellanger és mtsai, 2014).

A DNS processzálás iniciációját a relaxáz biztosítja, feltehetőleg a plazmid által kódolt járulékos komponensekkel együtt. A relaxáz hasítja a DNS egyik szálát az *oriT* *nic* helyénél (5A ábra) és kovalensen kötődik az elhasított szál 5' végéhez (Bellanger és mtsai, 2014). Az egyszálú DNS-hasítást követően a relaxoszóma komplex több eleme leválik, és a relaxáz-DNS komplex a T4CP segítségével a membránokon átnyúló transzport komplexhez kapcsolódik, amelyet T4SS-nek nevezünk (5B ábra). Ez végzi a DNS transzferet a donor sejtből a recipiens sejtbe, miközben a donor sejtben a transzportált DNS szál *rolling-circle* replikáció révén újraszintetizálódik (Bellanger és mtsai, 2014; Guédon és mtsai, 2017). Végül a transzfer után az egyszálú plazmid DNS replikációja is végbe megy a recipiens sejtben (5C-D ábra). A relaxáz részt vesz mind a transzfer, mind a plazmid *rolling-circle*-szerű replikációja és recirkularizációja iniciációjában (Bellanger és mtsai, 2014; Guédon és mtsai, 2017).



##### 5. ábra Az F plazmid konjugatív transzferének lépései.

A) Egy relaxáz (Mob) dimer a cirkuláris DNS *oriT*-jéhez kötődik. B) A Mob monomer elhasítja az *oriT*-t a DNS szál *nic* helyén és kovalens kötést alakít ki az 5' végén. A *rolling-circle* replikáció során a T4CP-k felismerik a DNS-hez kötődő Mob monomert és a T4SS párosodási formáció (*mating pair formation*, Mpf) struktúráján keresztül átsegítik a recipiens sejtbe a hasított DNS szálakat. C) A transzferált DNS szál replikációja megkezdődik a recipiens sejtben is. D) A Mob fehérje recirkularizálja a kettősszálú plazmid DNS-t a donorban és a recipiensben. A szürke vonalak és a kék téglalap az eredeti DNS szálakat és az *oriT*-t, a pontozott vonalak és fehér téglalapok az újonnan szintetizált DNS-t és *oriT*-t, a vékony fekete vonalak a sejtmembránokat jelölik. (Bellanger és mtsai, 2014 alapján)

A konjugációval kapcsolatban megemlíthető a „kizáródás” (*exclusion*) folyamata, amely gátolja a DNS transzlokációját azok között a sejtek között, amelyek azonos vagy nagyon hasonló plazmidokat hordoznak. Az *exclusion* kétféle módon mehet végbe: a felszíni kizáródás (*surface exclusion*) folyamata során nem jön létre a közeli sejt-sejt kapcsolat a donor

és recipiens között, míg a belépési kizáródás (*entry exclusion*, Eex) során a konjugációs apparátus formálódása után akadályozza a DNS transzlokációját (Humbert és mtsai, 2019).

Garcillán-Barcia és mtsai szekvencia analízis alapján a konjugatív plazmidokat relaxázaik alapján hat nagy csoportba sorolta: MobC (pl. pAD1, pCRY), MobQ (pl. pSC101, pAB14, pSymA), MobP (pl. IncQ2, IncG, IncI2, IncP6, IncU csoportok plazmidjai), MobV (pl. pMV158), MobF (pl. R388, R46), MobH (pl. pIP1202, pCAR1). A nagyméretű konjugatív plazmidok relaxázai többségében a MobF és MobH csoportokba tartoznak (Garcillán-Barcia és mtsai, 2009).

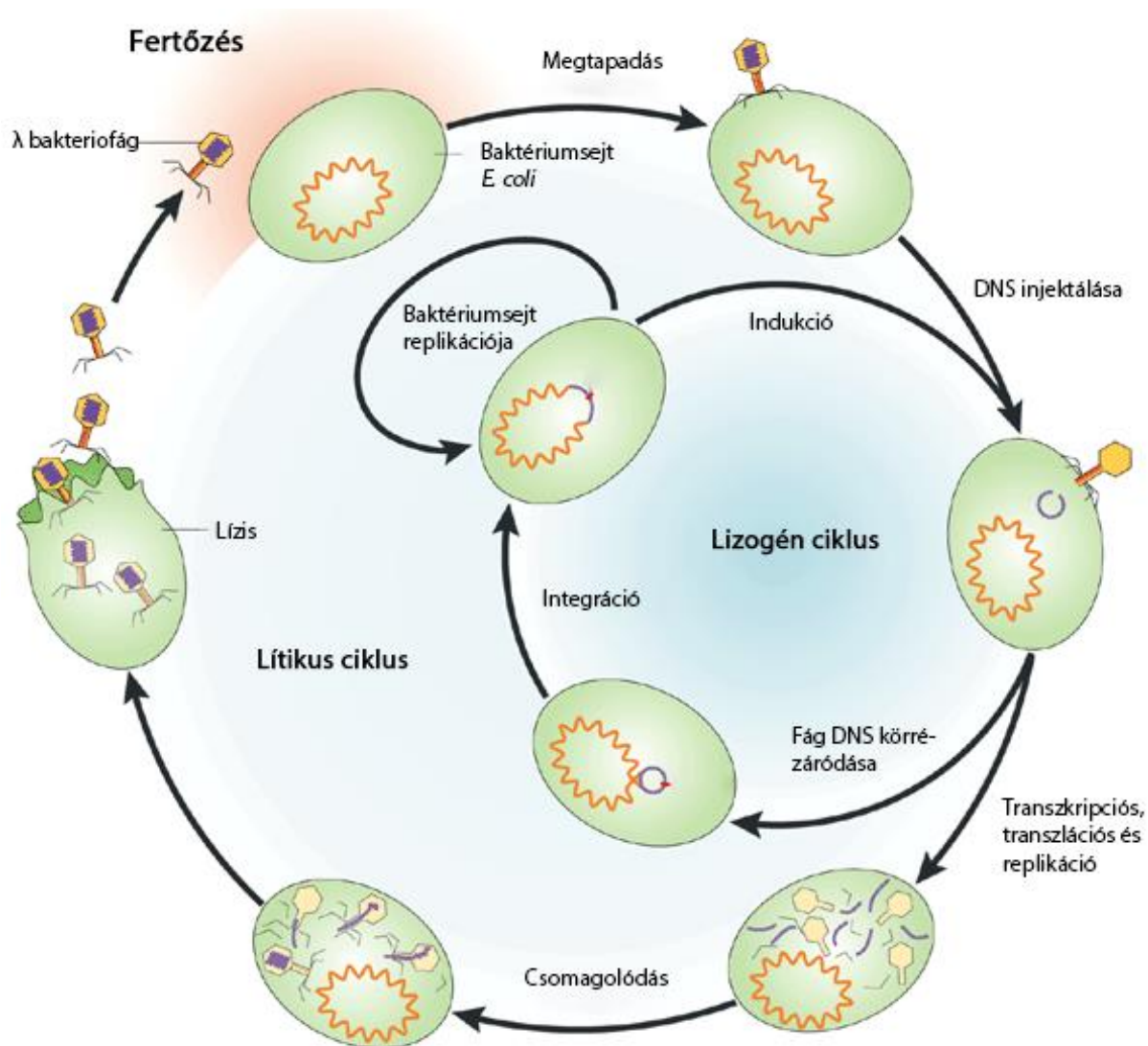
A MobH1 és MobH2 csoportok relaxázainak két jellegzetes motívuma van: egy hisztidin-gazdag (3H) motívum és egy HD motívum (HD-hidrolázok motívuma alapján). A katalitikus tirozin (Y63) konzervált a MobH1 csoportban, míg ez a katalitikus hely kevésbé konzervált a MobH2 csoportban, ahol a katalízisben egy másik tirozin (Y47) vehet részt (Garcillán-Barcia és mtsai, 2009). A MobH1 csoportot felosztották további két alcsoportra, a MobH11 és MobH12 csoportokra. A MobH12 alcsoportba tartoznak a kutatásainkban fontos szerepet betöltő IncA/C plazmidok és az SXT/R391 ICE-k relaxázai (Garcillán-Barcia és mtsai, 2009).

A konjugatív plazmidok hatékony eszközei más MGE-k terjedésének is. A növekvő számú plazmid szekvenciák alapján a 20 kb-nál nagyobb méretű plazmidok DNS-e 5-20%-ban, szélsőséges esetben 40%-ban tartalmazott IS elemeket (Jackson és mtsai, 2011), de emellett hordozhatnak Tn-okat vagy GI-eket, mint pl. az IncA/C csoportba tartozó R16a plazmid, amely egy GISul2 szigetet, illetve egy antibiotikum rezisztencia szigetet (*antibiotic resistance island*, ARI) is hordoz, utóbbi egyes részeit különböző Tn-ok alkotják (TnI, Tn6020, Tn6333, illetve egy csonka Tn5393) (Szabó és mtsai, 2016).

### 1.2.2 Bakteriofágok

A bakteriofágok olyan vírusok, amelyek baktériumokat fertőznek és így a HGT fontos közvetítői prokariótákban (Jackson és mtsai, 2011). A litikus fágoknak csak litikus, míg a mérsékelt fágoknak két életciklusa van: a lizogén és litikus fázis (6. ábra) (Campbell, 2003). A lizogén fázisban a bakteriofágok a bakteriális kromoszómára integrálódnak, ezt az állapotukat profágoknak nevezik (Fillol-Salom és mtsai, 2019). A bakteriális kromoszómára integrálódott profág hozzájárulhat a baktériumok patogenitásához, képes avirulens törzset virulenssé tenni, emellett hordozhat pl. TA rendszert is (Jackson és mtsai, 2011).





**6. ábra A bakteriofágok életciklusai az *E. coli* λ bakteriofágjának példáján keresztül.**

A bakteriofág a baktérium sejtfelszínéhez tapad farokrészével, majd a fág az örökítő anyagot sejten belülre fecskendezi. A sejtbe bejutott lineáris DNS körré záródik. A fág DNS replikációjának két útvonala van:  $\theta$ - vagy *rolling circle* replikáció. *Rolling circle* replikáció esetén a sejtek a litikus fázisba lépnek, ahol a bakteriofág kapszid és farokrészének fehérjéi termelődése után a bakteriofág újra összeáll (csomagolódik), majd a sejt lízise után ismét kikerül a környezetbe. A lizogén fázisban a fág DNS a bakteriális kromoszómára integrálódik, így replikációja a bakteriális sejt replikációjával együtt megy végbe ( $\theta$ -replikáció). A lizogén fázisból újra litikus fázisba léphet a bakteriofág kivágódásának indukcióját követően (Campbell, 2003 alapján).

Amikor a fág litikus fázisba lép, a fág replikációja indukálódik és a fág által termelt fehérjék és a fág DNS-e virionokba csomagolódik, majd a baktériumsejt elpusztul, így a bakteriofágok kijutnak a környezetbe. A virionok bizonyos hányadába bakteriális DNS is csomagolódhat. Ezen defektív fágok által történő DNS transzfert transzdukciónak nevezzük (Fillo-Salom és mtsai, 2019).

Egyik típusa az általános transzdukció, amely során a gazdabaktérium degradálódó kromoszómájának részei véletlenszerűen a kapszidba csomagolódnak, amelyek azután a recipiens gazdasejt kromoszómájával rekombinálandhatnak, ilyen a transzdukciója pl. a

széleskörben alkalmazott P22 fágnek. A transzdukció másik típusa a speciális transzdukció, amely során a profág „hibás” kivágódása miatt a fág integrációs helyétől valamelyik irányban a kromoszóma egy része csomagolódik a fággenom egy része helyett. Speciális transzdukció jellemző pl. a  $\lambda$  bakteriofágra, amennyiben a profág kivágódása a kromoszómáról nem pontos. A  $\lambda$  fág kizárólag a *gal* vagy a *bio* különböző régióit tudja magával ragadni, mivel az integrációs helye (*attB*) e két operon között található. A fág fertőzéssel a gazdabaktérium előnyös tulajdonságokra is szert tehet (pl. antibiotikum rezisztencia gének transzfere) (Tomono és mtsai, 1989; Fillol-Salom és mtsai, 2019).

Az integratív lizogén fágok a gazdasejt megfertőzése után helyspecifikus rekombinációval integrálódnak a kromoszómába (lizogén fázis), melyet a fágok által kódolt rekombináz/integráz (*integrase*, Int) katalizál. A rekombináció a kromoszomális *attB* hely, illetve a fág *attP* helye között zajlik le (Dorman és Bogue, 2016). A fágok bakteriális genomról való kivágódásában szintén részt vesz az Int, azonban ehhez a folyamathoz szüksége van további, a rekombináció irányát meghatározó faktorokra (*recombination directionality factor*, RDF), például az excizionáz (*excisionase*, Xis) fehérjére (Dorman és Bogue, 2016).

A bakteriofágokból ismert helyspecifikus rekombinázok, melyeknek más szerepük is lehet a baktériumokban, két nagy családba sorolhatók az enzim katalitikus szerkezete, illetve az ebben központi szerepet játszó anminosavak alapján. A korábban invertázként ismert tirozin, illetve a resolvázként emlegetett szerin rekombinázok családjába.

A tirozin rekombinázok működésükhöz további fág- (Xis), illetve egyéb gazdafaktor fehérjéket (pl. IHF, HU) igényelnek, és általában hosszabb *attP* helyet ismernek fel (Groth és Calos, 2004). Ilyen pl. az *Escherichia coli*  $\lambda$  bakteriofág integrációs rendszere, amelyet *E. coli* K-12 modellrendszerben tanulmányoztak (Lederberg és Lederberg, 1953). A  $\lambda$  integráz az egyik legtöbb tagot számláló rekombináz csoport, a  $\lambda$  Int család, első ismert képviselője és egyben névadója lett.

A szerin rekombinázok nagyobb méretű fehérjék, nincs szükségük további gazdafaktorra a működésükhöz és rövidebb *attP* szekvenciákat is felismernek. A  $\Phi$ C31 és R4 bakteriofágok szerin rekombinázt használnak integrációjukhoz és kivágódásukhoz (Groth és Calos, 2004).

A szerin rekombinázok közé sorolt resolvázok két DR, míg az invertázok két IR szekvencia közötti rekombinációt katalizálnak, amelynek eredménye a DR vagy IR szekvenciák által közrefogott DNS szakasz deléciója vagy inverziója (Smith és Thorpe, 2002).

### 1.2.3 Genomi szigetek

A plazmidok és bakteriofágok mellett a leggyakrabban előforduló komplexebb MGE-k a genomi szigetek. A GI-k általában nagyobb DNS szegmentek, a bakteriális kromoszóma GC-tartalmához képest gyakran magasabb GC-tartalom jellemzi őket és általában 16-20 bázispárnnyi (bp) DR szekvenciák határolják őket (Juhas és mtsai, 2009; Daccord és mtsai, 2013). Gyakran hordoznak más MGE-eket, pl. integronokat, IS elemeket és Tn-okat (Juhas és mtsai, 2009).

A GI-eket több szempont alapján lehet csoportosítani. Az általuk hordozott, a gazdabaktérium számára előnyös tulajdonságok alapján léteznek szimbiózis szigetek, metabolikus szigetek, rezisztencia szigetek, fitness szigetek és patogenitási szigetek (*pathogenicity island*, PAI) (Juhas és mtsai, 2009). Ilyen PAI pl. a *Salmonella* SPI-1 és SPI-2, melyek a virulenciáért felelős funkciókat, illetve a 3-as típusú szekréciós rendszer (*type III secretion system*, T3SS) elemeit kódolják (Schmidt és Hensel, 2004).

A sziget mobilitása alapján is lehet csoportokat kialakítani. A GI-k egy része soha nem is volt, vagy már nem mobilis, mint az SPI-1-5. A mobilis GI-k két további két csoportot alkotnak, így beszélhetünk integratív és konjugatív elemekről (ICE), valamint integratív és mobilizálható elemekről (IME) (Juhas és mtsai, 2009). Az ICE-k kivágódva a kromoszómáról cirkuláris formát vesznek fel, majd konjugációval terjednek, végül helyspecifikus rekombinációval integrálódnak a recipiens baktérium kromoszómájára (Dobrindt és mtsai, 2004). A mobilis GI-k gyakran kódolnak integrázokat vagy más faktorokat, amelyek a plazmidok konjugációs rendszereihez vagy a bakteriofágok transzferéhez köthetők, így feltételezhetően együtt evolválódtak bakteriofágokkal és plazmidokkal, ezáltal egyfajta hibrid struktúrát létrehozva (Juhas és mtsai, 2009; Jackson és mtsai, 2011). Mindezek alapján az ICE-k autonóm elemek mind a transzferre, mind az integrációra nézve, míg az IME-k csupán az integrációra nézve autonómok, konjugatív transzferükhöz szükségük van egy segítő (továbbiakban *helper*) konjugatív elem jelenlétére (Bellanger és mtsai, 2014).

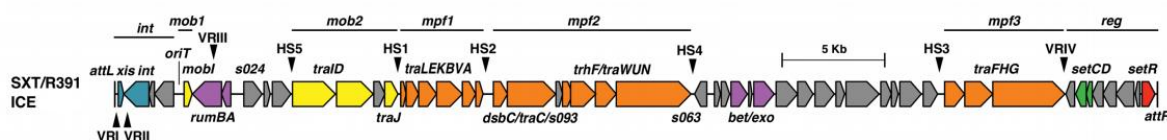
#### 1.2.3.1 Integratív és konjugatív elemek

Az integratív és konjugatív elemek csoportja rendkívül sokszínű. Ide tartoznak korábban konjugatív transzpozonnak (*conjugative transposon*, CTn), integratív plazmidoknak, genomi szigeteknek, szexfaktornak nevezett elemek, mint a legkorábban leírt ICE-k: Tn916 (*Enterococcus faecalis* (Scott és Churchward, 1995)), CTnDOT (*Bacteriodes*

*thetaitaomicron*) (Whittle és mtsai, 2002) vagy pSAM2 (*Streptomyces ambofaciens*), pRS01 (*Lactococcus lactis*), és az SXT (*Vibrio cholerae*) (Bellanger és mtsai, 2014). Eleinte az ICE-k csoportját CTn-oknak nevezték, mivel a kromoszóma különböző helyeire integrálódtak (Bellanger és mtsai, 2014). Burrus és mtsai javasolták az „ICE” elnevezést az alapján, hogy integrációjuk, kivágódásuk és konjugatív transzferük hasonlóságokat mutat (Burrus és mtsai, 2002). Az ICE-k gyakran további MGE-eket is (IS elemeket, Tn-okat és integronokat) hordoznak (Jackson és mtsai, 2011).

Az ICE-k integrációja és kivágódása a sziget által kódolt tirozin rekombináázok, szerin rekombináázok, illetve ritkán DDE TPáz-ok működésén alapul (Jackson és mtsai, 2011; Bellanger és mtsai, 2014). Újabban számos ICE-ről kiderült, hogy a  $\lambda$  bakteriofághoz hasonló módon megy végbe integrációja és kivágódása (Burrus és Waldor, 2004). A helyspecifikus rekombináció a bakteriális kromoszóma *attB* helye és az ICE *attP* helye között történik meg (Delavat és mtsai, 2017). A helyspecifikus rekombináció célpontja, azaz az integráció helye a kromoszómán gyakran egy konzervált tRNS gén 3' vége (Jackson és mtsai, 2011). Az ICE-k kromoszómára való integrációja biztosítja az ICE-k replikációját és továbbörökítésüket a leánysejtekbe (Bellanger és mtsai, 2014).

Az SXT/R391 ICE-k nagy családjába tartozó elsőként izolált SXT (7. ábra) jó példa az ICE-k működésének bemutatására (Poulin-Laprade és mtsai, 2015b). A *Vibrio cholerae*-ben azonosított SXT a  $\lambda$  bakteriofághoz hasonló rekombinációs rendszert használ integrációjához és kivágódásához. A sziget helyspecifikus rekombinációval integrálódik a *prfC* gén 3' végébe. A *prfC* gén hiányában az SXT képes másodlagos *att* helyekre is beépülni, mint pl. a *pntB* 5' vége. A kromoszómáról való kivágódás után extrakromoszomális cirkuláris formát vesz fel. Mind az integráció, mind a kivágódás az SXT által kódolt rekombinááz/integráz (Int) működésén alapul. Az SXT-ben azonosítottak egy *xis* gént is, amely a kivágódás indukálásához és a kromoszómára való integráció gátlásához szükséges RDF. Az SXT kivágódását a szigeten kódolt SetCD regulátor indukálja (Burrus és Waldor, 2003).



**7. ábra Az ICE-k konzervált gerincének sematikus térképe az SXT/R391 ICE-k példáján.**

A konzervált gerinc különböző funkciókat ellátó génjeit az alábbi színek jelölik: integráció/kivágódás (kék), transzfer iniciáció (sárga), konjugáció (narancssárga), transzkripció aktivátor (zöld), homológ rekombináció vagy hibajavítás (lila), transzkripció represszor (piros), más és ismeretlen funkciójú gének (szürke). A variábilis kiegészítő modulok helyeit fekete nyilak jelölik (HS1-5 és VRI-I-IV). A kromoszomális *attL* és *attR* helyeket az ICE két végén függőleges vonalak jelölik (Poulin-Laprade és mtsai, 2015b alapján).

Az ICE-k gyakran olyan, a gazda baktérium számára előnyös géneket hordoznak, mint pl. virulencia determinánsok, antibiotikum rezisztenciagének, amelyek hozzájárulnak a baktériumok sikeres és gyors adaptálódásához az új környezetben, illetve új *niche*-ek kolonizálásához (Burrus és Waldor, 2004; Carraro és Burrus, 2015). A HGT megtörténhet közeli és távoli rokonságban álló baktériumfajok között egyaránt (Burrus és Waldor, 2004). Az elsőként izolált SXT pl. rezisztenciagéneket kódol, amelyek által a baktérium rezisztens lesz a sulfamethoxazol, trimethoprim, kloramfenikol és streptomycin antibiotikumokra, de emellett azonosítottak más SXT variánsokat is, amelyek a prototípushoz képest különböztek a rezisztenciagénjeikben, sőt olyat is, amely nem hordoz rezisztenciagéneket (Burrus és Waldor, 2003).

Az ICE-k átvitele az általuk kódolt konjugációs apparátus által valósul meg, amely hasonlít a plazmidok konjugációs rendszereihez (Carraro és Burrus, 2015). Az SXT konjugációs apparátusának génjeit a SetCD mesterregulátor szabályozza. A *setCD* operont a SetR represszor gátolja. A SetR gátlása a gazdabaktérium SOS-stresszválaszának aktiválódása esetén megszűnik. Az SXT/R391 ICE-k konjugatív transzfere az F plazmidok konjugációjához hasonló módon megy végbe (Poulin-Laprade és mtsai, 2015a).

Az ICE-k stabil fennmaradását (vertikális transzfer) elsősorban a bakteriális kromoszómára való integrációjuk biztosítja a kromoszóma replikációja révén – így az ICE-k általánosan profág módjára képesek megmaradni integrálódott formában (Carraro és Burrus, 2015). A kivágódást követően a cirkuláris forma átmeneti stabilitása az ICE saját replikációs rendszerének köszönhető. A *rolling-circle* replikációt az ICE relaxáza iniciálja együtt más faktorokkal, amelyeket az ICE és a gazdabaktérium kódol (Carraro és Burrus, 2015). Az ICE-k további stabilizációs rendszereket is hordozhatnak. Az SXT/R391 ICE-k esetében például egy funkcionális plazmid-szerű II-es típusú partíciós rendszer (SrpMRC rendszer) segíti a cirkuláris intermedier stabil fennmaradását a kivágódás után (Carraro és Burrus, 2015). Az ICE-k stabilitását TA rendszerek is segíthetik, mint az SXT MosAT és az R391 HipAB rendszere. A *mosAT* expresszióját olyan faktorok segítik elő, amelyek az SXT kivágódásához szükségesek, így a TA rendszer az intermedier cirkuláris forma képződésével párhuzamosan aktiválódik, amikor az ICE stabilitása sebezhetőbbé válik. A MosT gátolja az SXT-t nem hordozó utódsejtek növekedését, ezzel minimalizálva az SXT-t vesztett baktériumpopuláció méretét, míg a MosA a MosT hatását megszünteti az SXT-t hordozó sejtekben (Wozniak és Waldor, 2009).

### 1.2.3.2 Integratív mobilizálható elemek

Az IME-k, amelyeket korábban mobilizálható Tn-okként is ismertek, olyan elemek, amelyeknek kivágódása és integrációja autonóm módon, konjugatív transzferük viszont nem-autonóm módon megy végbe, melyhez rokon vagy nem rokon konjugatív elemek transzfer apparátusát használják (Bellanger és mtsai, 2014; Guédon és mtsai, 2017).

Az IME-k profágokhoz és az ICE-khez hasonlóan a bakteriális kromoszómára integrálódnak, amelyhez tirozin vagy szerin rekombinázt vagy egyes esetekben DDE transzpozázt használnak (Bellanger és mtsai, 2014).

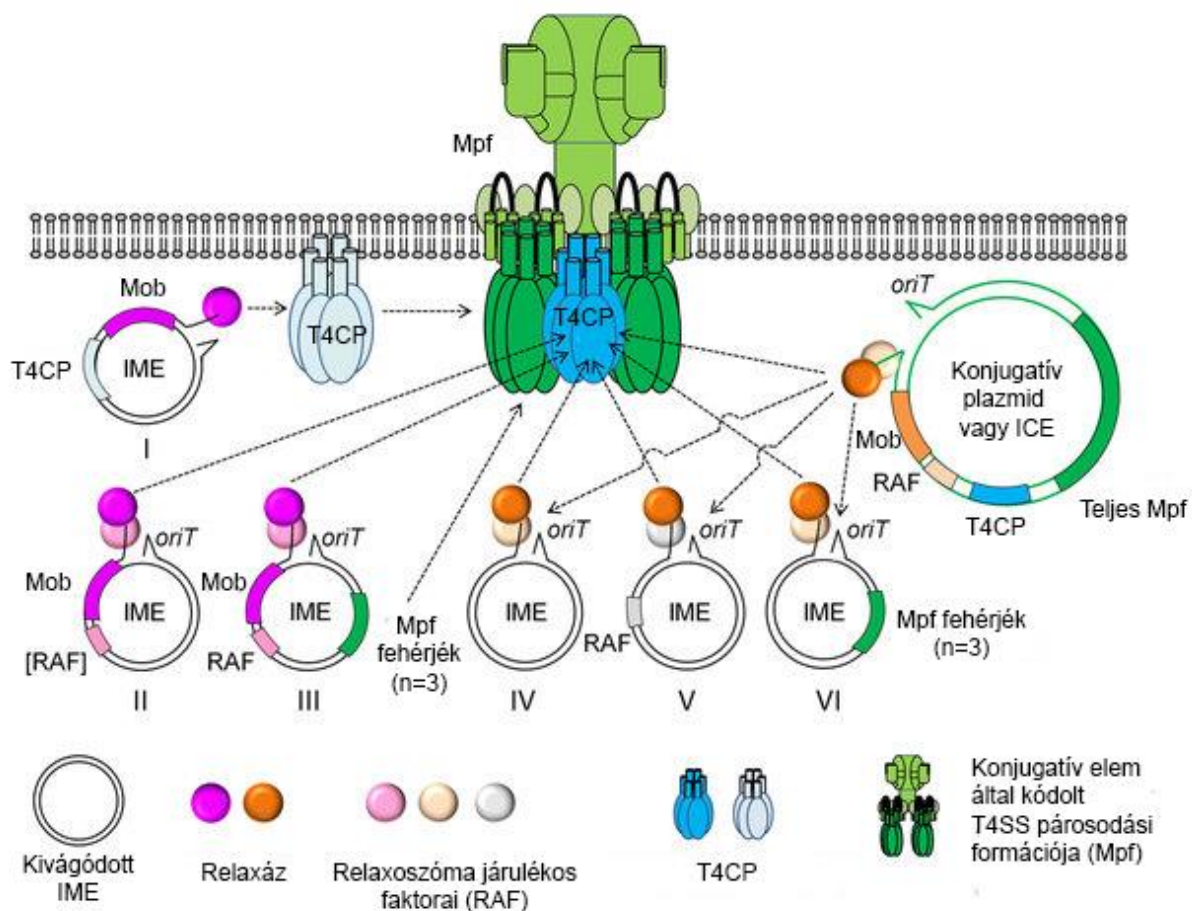
A legtöbb IME rendszerint valamilyen tirozin rekombinázt/integrázt (Int) és RDF-t (Xis) is kódol, hasonlóan a  $\lambda$  fághoz, de előfordulnak bidirekcionális tirozin rekombináztok is, amelyeknek nincs szükségük RDF-ra a kivágódásukhoz, mint pl. az Ecoc54N GI esetében (Bellanger és mtsai, 2014). Az ICE-khez hasonlóan sokszor a gén 3' végébe integrálódnak. A tirozin rekombinázt kódoló MGIVchHai6 helyspecifikusan a *trmE* 3' végébe integrálódik (Carraro és mtsai, 2017b). Az ICE6180-RD.1 szerin rekombinázt kódol és szintúgy helyspecifikusan integrálódik a *rumA* gén 3' végébe (Bellanger és mtsai, 2014). Tirozin rekombináztokat kódol pl. a Tn4399, Tn4555 és Tn5520, illetve szerin rekombináztokat kódol pl. a Tn4451, de ezeknek az IME-knek az integrációja nem helyspecifikus (Bellanger és mtsai, 2014). A DDE transzpozázokat kódoló IME-k integrációja szintén nem helyspecifikus módon történik (pl. MTnSag1 és tISCpe8) (Bellanger és mtsai, 2014).

Az IME-k más mobilis elemekhez hasonlóan számos számukra és így a gazdabaktérium számára is előnyös tulajdonságot kódolnak. Főként antibiotikum rezisztenciagéneket, bakteriocin szintézis génjeit vagy c-di-GMP szintézis génjeit hordozzák, de más előnyös géneket is tartalmazhatnak (Bellanger és mtsai, 2014). A 47 kb méretű MGIVchHai6 konzervált gerince nagyjából 8 kb méretű, amely a fenntartáshoz és a transzfer funkciókhoz szükséges géneket foglalja magába. A konzervált gerinc mellett a 39 kb-nyi kiegészítő modulok közül az In36AI integront érdemes megemlíteni, amely multidrog rezisztenciája (MDR) révén számos antibiotikum ellen nyújt védelmet a gazdabaktérium számára, mint pl.  $\beta$ -laktámok, florfenikol/kloramfenikol, streptomycin/spektinomycin, sulfamethoxazolok és trimethoprim, illetve tetraciklinek. Midemellett az MGIVchHai6 olyan géneket is hordoz, amelyek ellenállóvá teszik a gazdabaktériumot fágfertőzéssel, illetve nehézfémekkel (pl. higany) szemben (Carraro és mtsai, 2017b).

Az IME-k nem kódolják az átvitelükhöz szükséges konjugációs apparátust, nincs vagy csak limitált készletük van *tra* génekből, így szükségük van egy másik konjugatív plazmid,



vagy ICE (*helper* elem) jelenlétére, melynek transzfer rendszerét kihasználva képesek horizontális átvitelre (Douard és mtsai, 2010; Daccord és mtsai, 2013; Bellanger és mtsai, 2014). Az MGIV*ch*Hai6 IME-t az IncA/C plazmidok, míg az MGIV*f*Ind1-et az SXT/R391 ICE-k konjugációs apparátusa képes mobilizálni (Carraro és mtsai, 2017b). Általánosan rendelkeznek *oriT* szekvenciával, többnyire kódolnak relaxázt és a relaxoszómához szükséges fehérjéket, illetve olykor a T4SS egyes elemeit is (Daccord és mtsai, 2013; Bellanger és mtsai, 2014; Guédon és mtsai, 2017). Ennek megfelelően az IME-k mobilizációs stratégiája (8. ábra) így rendkívül változatos lehet (Guédon és mtsai, 2017).



#### 8. ábra Az IME-k mobilizációjának különféle stratégiái.

A konjugatív plazmidok és ICE-k minden szükséges fehérjét kódolnak autonóm konjugatív transzferükhöz, beleértve a relaxázokat (Mob) (lila és narancs), a relaxoszóma járulékos faktorait (*relaxosome accessory factors*, RAF) (rózsaszín, világossárga, szürke), a T4CP (kék és világoskék) és a T4SS elemeit (Mpf) (zöld). Az IME-k a konjugatív elemeket használják saját konjugatív transzferükhöz: I. kódolhatnak relaxázt és T4CP-t (konjugatív elem Mpf toborzása), II. egy relaxázt és további RAF-t (konjugatív elem T4CP elemeinek toborzása), III. egy relaxázt, RAF-t és 3 Mpf fehérjét (konjugatív elem T4CP és Mpf elemeinek toborzása), IV. hordozhatnak csupán egy *oriT*-t (konjugatív elem relaxázának toborzása), V. egy *oriT*-t és kódolhatnak RAF-t (relaxáz toborzása), VI. hordozhatnak egy *oriT*-t és kódolhatnak 3 Mpf fehérjét. A mobilizálható és a *helper* elemek közötti kölcsönhatásokat nyilak jelölik (Guédon és mtsai, 2017 alapján).

Az IME-k stabil fenmaradását a profágokhoz és az ICE-khez hasonlóan elsősorban szintén a kromoszómára való integráció biztosítja. Emellett néhány IME kódol olyan fehérjéket, amelyek szekvencia homológia alapján feltehetően replikációs vagy partíciós funkciókat látnak el (pl. BcenGI2, IME\_2603\_rpsI), segítve ezzel az IME extrakromoszomális fennmaradását a kivágódást követően, de ezek a funkciók többségében felderítetlenek (Bellanger és mtsai, 2014).

## **2. A Salmonella Genomic Island 1 és az IncA/C plazmidok kapcsolata**

### **2.1. Salmonella Genomic Island 1**

A humán ételeredetű megbetegedések nagy hányadát csupán néhány *Salmonella* szerotípus okozza a több, mint 2500 szerotípusból, a legtöbbet a *S. enterica* Typhimurium (*S. Typhimurium*) és a *S. Enteritidis* (Mead és mtsai, 1999; Threlfall, 2000).

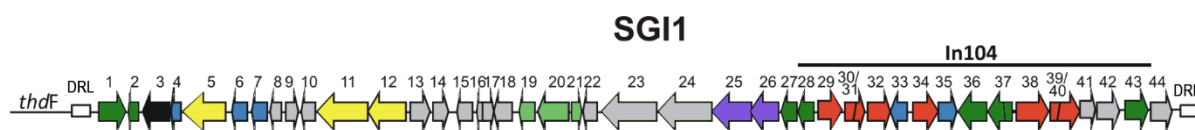
A *S. Typhimurium* DT104-et elsőként 1989-ben azonosították humán izolátumban, majd a '90-es években globálisan elterjedt világszerte, így egyre gyakrabban okozott humán megbetegedéseket és zoonózisokat (Threlfall, 2000; Helms és mtsai, 2005). A *S. Typhimurium* DT104 okozta megbetegedések száma növekedett világszerte, míg a más szerotípusok által okozott megbetegedések gyakorisága ezzel szemben csökkent (Glynn és mtsai, 1998; Helms és mtsai, 2005).

Bár a DT104 fágtypust 1960-ban írták le elsőként, az 1980-as években azonosítottak egy MDR törzset az Egyesült Királyságban, amely olyan rezisztenciagéneket hordozott, amelyek rezisztenciát biztosítottak ampicillin, kloramfenikol, streptomycin, sulfonamid és tetraciklin antibiotikumok ellen (ACSSuT fenotípus), amely antibiotikumok közül többet a mezőgazdaságban meglehetősen nagy gyakorisággal alkalmaztak (Threlfall, 2000; Cloeckert és Schwarz, 2001).

A *S. Typhimurium* DT104 MDR fenotípusáért a kromoszómára integrálódott *Salmonella* Genomic Island 1 (SGI1) tehető felelőssé, amelyről kiderült, hogy egy 42.4 kb méretű IME, amely összesen 44 ORF-ból áll (9. ábra). A SGI1 konzervált gerincét 29 prediktált ORF alkotja (Boyd és mtsai, 2000; Mulvey és mtsai, 2006), illetve a konzervált gerincbe egy 14 kb méretű In4 csoportba sorolható komplex C1 integron régió (In104) ékelődik, amely az antibiotikum rezisztenciához szükséges kazettákat hordozza (Boyd és mtsai, 2001; Mulvey és mtsai, 2006).



Az SGI1 elsődleges integrációs helye (*attB*) a *Salmonella thdF* génjének (*trmE* - *E. coli*) 3' végén található. A kromoszómába integrált szigetet 18 bp-nyi DR szekvenciák határolják (DRL és DRR) (Boyd és mtsai, 2001). A DRR azonos a *thdF* utolsó 18 bp-jával, míg a DRL valószínűleg az SGI1 kivágódott, szabad cirkuláris formájának *attP* helyéből származtatható (Doublet és mtsai, 2005). Az SGI1 integrációja által generált szekvenciaváltozás nem okoz változást a *thdF* által expresszált fehérje szekvenciájában. Az SGI1 általában egy kópiában található a kromoszómán, de 2-7 tandem ismétlődését is észlelték az *attB* helyen (Doublet és mtsai, 2008a).



#### 9. ábra Az SGI1 sematikus térképe.

Az SGI1 a *thdF* gén 3' végébe integrálódik, a 18 bp DRL és DRR (fehér téglalap) határolja. A sziget 3' végéhez közel egy In104 integron régió található, amelyben az antibiotikum rezisztenciát kódoló géneket piros szín jelöli. A mobilizációs funkciókat kódoló gének világoszöld, a rekombinációs funkciókat kódoló gének sötétzöld, a replikációs *repA* gén fekete, a transzkripció regulátorok kék, a konjugációs (*tra*) gének sárga, az *sgtAT* lila, az ismeretlen funkciójú gének szürke színnel jelöltek. A gének számozása az eredeti annotáció elnevezéseit követi (S001=1, S002=2, ..., S044=44).

Az SGI1 különböző variánsait számos más *Salmonella* szerotípusban megtalálták, pl. Agona, Albany, Paratyphi B, Meleagridis, Newport, Derby, Cerro, Kiambu, Emek, Düsseldorf és Infantis (Meunier és mtsai, 2002; Doublet és mtsai, 2003, 2004, 2012; Ebner, 2004; Levings és mtsai, 2005). Ezek az SGI1 variánsok a DT104-ben azonosított prototípushoz képest főként az In104 integron régióban található antibiotikum rezisztencia génekben különböznek, ami sok esetben komplex átrendeződéseknek köszönhető (Hall, 2010; Kiss és mtsai, 2012).

Az utóbbi évtizedekben az SGI1 különböző variánsait azonosították *Proteus mirabilis*-ben (PGI1) (Boyd és mtsai, 2001; Levings és mtsai, 2005; Doublet és mtsai, 2008b), az utóbbi néhány évben pedig további variánsokat találtak *Acinetobacter baumannii*-ban (AGI1) (Hamidian és mtsai, 2015), *Morganella morganii*-ban (MGI1) (Schultz és mtsai, 2017), *Providencia stuartii*-ban (SGI1-W) (Soliman és mtsai, 2018) és *E. coli*-ban (SGI1-B) is (Cummins és mtsai, 2019). Az AGI1 variánst azonosították már *Enterobacter cloacae*-ben, *Salmonella enterica*-ban és *Vibrio cholerae*-ben is (Siebor és mtsai, 2019). Emellett felfedeztek integron régió nélküli SGI1-rokonokat is, amelyek az SGI1 evolúciójának korábbi stádium-

mait reprezentálhatják, az SGI0-át *Proteus mirabilis*-ben (de Curraize és mtsai, 2020), illetve a VGI-t *Vibrio cholerae*-ben (Cummins és mtsai, 2020).

Az integráció és a kivágódás meghatározó jelentőségű a sziget vertikális és horizontális átvitelében. Az SGI1 integrációja biztosítja a stabil vertikális átvitelt. Az SGI1 mobilizációja során viszont a sziget kivágódik és extrakromoszomális cirkuláris formában alkalmassá válik a horizontális transzferre. A kivágódott állapot azonban a sziget esetleges elvesztésével járhat.

Az SGI1 5' végén kódolt helyspecifikus rekombinációs rendszer (Int-Xis) hasonlóságot mutat az SXT/R391 ICE-k Int-Xis rendszerével (Doublet és mtsai, 2005). Az SGI1 e rendszer segítségével, lényegében az Int működése révén, autonóm módon integrálódik kromoszomális *attB* helyére (Doublet és mtsai, 2005; Daccord és mtsai, 2010).

Az Int és Xis expresszióját kimutatták SGI1-et hordozó *S. Typhimurium* LT2 törzsben (Golding és mtsai, 2007), azonban az SGI1 spontán kivágódása alig detektálható és véletlenszerű vesztődése sem figyelhető meg *helper* plazmid hiányában (Boyd és mtsai, 2000, 2001; Djordjevic és mtsai, 2009; Kiss és mtsai, 2012). A Xis expressziójának növekedése indukálja az SGI1 kivágódását (Carraro és mtsai, 2014a; Kiss és mtsai, 2015), ami a sziget mobilizációjának egyik alapfeltétele, és az SGI1 kivágódott, körre záródott cirkuláris formájának képződéséhez vezet.

## 2.2. IncA/C plazmidok

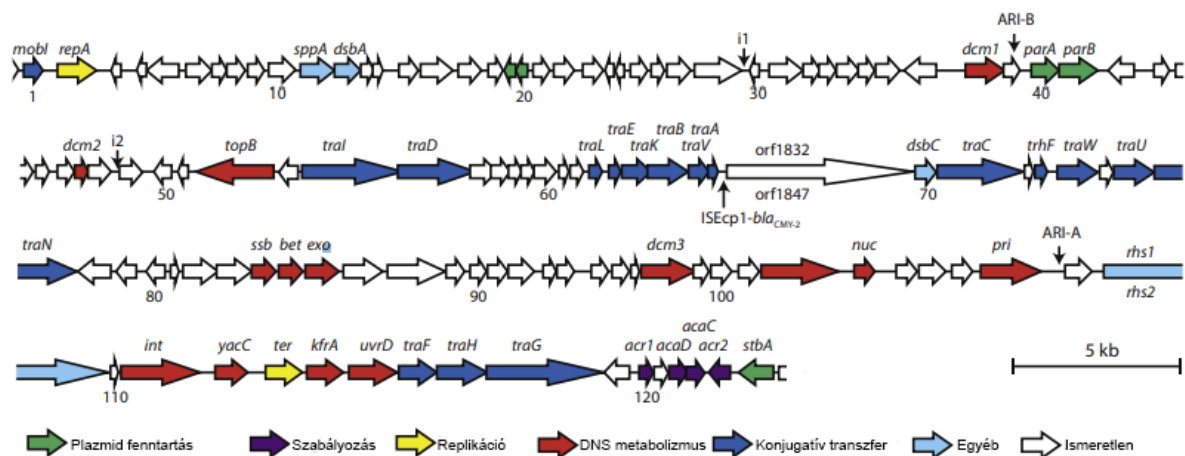
A közeli rokon IncA és IncC családba tartozó széles gazdaspektrumú plazmidok általában akár 5-6 rezisztenciagént is hordoznak, így igen gyakran felelősek számos  $\gamma$ -Proteobacteria faj MDR törzseinek kialakulásáért. Leggyakrabban az *Enterobacteriaceae* család fajaiban azonosítottak IncA/C plazmidokat, beleértve a *Salmonella*, *Klebsiella* és *Escherichia* nemzetségekbe tartozó patogéneket, de találtak már *Vibrio* (*Vibrionaceae*), *Aeromonas* (*Aeromonaceae*), *Pseudomonas* (*Pseudomonadaceae*) és *Morganella* (*Morganellaceae*) nemzetség fajaiban is (Welch és mtsai, 2007; Fricke és mtsai, 2009; Fernández-Alarcón és mtsai, 2011; Johnson és Lang, 2012; Carraro és mtsai, 2014b; Folster és mtsai, 2014; Harmer és Hall, 2015; Wang és mtsai, 2015; Hancock és mtsai, 2016).

Az IncA és IncC plazmidok nagyméretű (>110 kilobázis), alacsony kópiaszámú, cirkuláris plazmidok (Poulin-Laprade és mtsai, 2015a; Hancock és mtsai, 2016). Az IncA és IncC csoport tagjainak konzervált gerince közeli rokonságot mutat egymással, mégis kompatibilisnek bizonyultak, így két inkompatibilitási csoportot alkotnak (Datta és Hedges, 1973;

Ambrose és mtsai, 2018), de nagyfokú hasonlóságuk miatt gyakran együttesen IncA/C plazmidokként hivatkoznak rájuk (Harmer és Hall, 2015). Az IncC család több száz szekvenált tagot számlál, míg az IncA csoportba csupán két szekvenált plazmid tartozik az RA1 plazmid és ennek egy deléciós származéka, az RAX (Fricke és mtsai, 2009).

Az IncA/C plazmidok összehasonlítása (Welch és mtsai, 2007; Fricke és mtsai, 2009; Fernández-Alarcón és mtsai, 2011; Carraro és mtsai, 2014b) azt mutatta, hogy a plazmid-gerincet alkotó gének >99%-ban konzerváltak. A csoport variabilitása a kiegészítő modulok változatosságából ered. Az IncA/C plazmidok (10. ábra) két nagyobb méretű ARI-t is hordozhatnak (ARI-A és ARI-B), az ARI-k pozíciója típusonként konzervált. Az IncA/C ARI-k a különböző virulencia faktorokat, rezisztenciagéneket vagy a nehézfémek elleni detoxifikációs apparátust integrálják, de emellett IS elemek és Tn-ok is azonosíthatók bennük. Ez utóbbiak azonban a plazmid konzervált gerincében is megtalálhatók (Doublet és mtsai, 2012; Harmer és Hall, 2015; Szabó és mtsai, 2016).

Az IncA/C plazmidok számos antibiotikummal szemben hatásos rezisztenciagént hordoznak. Ilyen antibiotikumok a különböző  $\beta$ -laktámok, aminoglikozidok, florfenikol/kloramfenikol, a folát útvonal inhibitorai (szulfonamidok és trimetoprim), quinolonok és tetraciklinek (Welch és mtsai, 2007; Fricke és mtsai, 2009).



**10. ábra Az IncA/C plazmidok konzervált gerincének sematikus térképe (pR148 plazmid).**

A nyilak az ORF-ok helyeit, méreteit és orientációját reprezentálják és minden tizedik ORF számozott. Az ARI-A és ARI-B konzervált integrációs helyeit fekete nyilak mutatják. A plazmid fenntartásában (zöld), szabályozásában (lila), replikációjában (sárga), DNS metabolizmusában (piros), konjugatív transzferében (kék), illetve más jellegű (világoskék) funkciók ellátásában résztvevő gének és ismeretlen funkciójú gének (fehér) színkóddal jelöltek (Harmer és Hall, 2015 alapján).

Az IncA/C plazmidok konjugatív rendszere rokonságot mutat az SXT/R391 ICE-kével (MobH12) (Wozniak és mtsai, 2009; Poulin-Laprade és mtsai, 2015a). Az SXT-k konjugációs génjei, operonjai (*tra* modulok, a relaxált kódoló *traI/mobI*) hasonlóságot mutatnak az

IncA/C csoportba tartozó plazmidok megfelelő moduljaival (Poulin-Laprade és mtsai, 2015a). A konjugációs gének sorrendje, szerveződése és egymáshoz viszonyított iránya a két rendszerben egyezik.

Az IncA/C plazmidok több, egymással nem rokon IME család tagjait képesek mobilizálni, mint pl. MGIV*mi1* (*Vibrio*) és SGI1 (*Salmonella*) (Douard és mtsai, 2010; Carraro és mtsai, 2014a, 2016).

### 2.3. Az SGI1 mobilizációja

Az SGI1 mobilizációját kizárólag IncA (pl. RA1) vagy IncC (pl. R55, R16a, IP40a, pVCR94, pRMH760) *helper* plazmidok jelenlétében tapasztalták (Douard és mtsai, 2010; Kiss és mtsai, 2012; Carraro és mtsai, 2014a; Harmer és mtsai, 2016). Más Inc csoportba tartozó plazmidokkal (IncFII, IncHI2, IncI1, IncL/M, IncN vagy IncP) az SGI1-et még nem sikerült mobilizálni (Douard és mtsai, 2010).

Az SGI1 a konjugatív transzferhez szükséges faktoroknak csak néhány tagját kódolja, ami nem elégséges az autonóm transzferhez (Doublet és mtsai, 2005; Daccord és mtsai, 2010; Carraro és mtsai, 2017a). Az SGI1 funkcionális *oriT*-vel és mobilizációs fehérjékkel (MpsA/S020 és MpsB/S019) rendelkezik, azonban minden hiányzó funkció tekintetében kihasználja az IncA/C plazmidok által kódolt konjugatív apparátust. Az SGI1 *oriT*-je egy 125 bp-nyi GC-gazdag szakasz számos IR motívummal, amely a mobilizációs gének közelében helyezkedik el (Kiss és mtsai, 2019) és nem hasonlít az IncA/C plazmidok *oriT*-jére. A mobilizációs fehérjék (MpsA és MpsB) bicisztronikus mRNS-ről transzlálódnak, bár az MpsB saját mRNS-ről is képződhet. Az MpsA a  $\lambda$  tirozin rekombinááz családhhoz tartozik és valószínűleg atipikus relaxázként funkcionál. Az SGI1 transzfere során az MpsA és MpsB egyaránt nélkülözhetetlen, míg a *helper* plazmid által kódolt relaxáz nem esszenciális a SGI1 transzféréhez. A konjugáció gyakorisága viszont jelentősen csökken (3-5 nagyságrenddel alacsonyabb) a *helper* relaxázának hiányában (Kiss és mtsai, 2019).

Megfigyelések alapján az SGI1 által kódolt T4SS alegységek (TraN/S005, TraG/S011, TraH/S012) szintén az SGI1 hatékonyabb átvitelében vehetnek részt (Carraro és mtsai, 2017a), de a mobilizációhoz nem feltétlenül szükségesek (Kiss és mtsai, 2012). Erre utalhat, hogy az SGI1 transzfer frekvenciája  $10^{-1}$ - $10^{-3}$  transzkonjugáns/recipiens értékek között mozog, ami gyakran meghaladja a *helper* plazmid transzferét (Douard és mtsai, 2010; Kiss és mtsai, 2012; Carraro és mtsai, 2014a). Az IncA/C plazmidokkal való hasonlóságuk miatt az SGI1 Tra fehérjei képesek helyettesíteni a plazmid homológ fehérjeit, együttes jelenlétükben

pedig elősegítik az SGI1 transzferét a *helper* plazmid transzferével szemben (Carraro és mtsai, 2017a).

Az SGI1 nem csupán kihasználja az IncC plazmidok transzfer apparátusát, hanem testre szabja a maga számára azáltal, hogy az IncA/C T4SS egyes alegységeit a saját Tra fehérje homológokra cseréli (Carraro és mtsai, 2017a). Ez a stratégia vélhetően növeli az SGI1 sikerét bakteriális populációkban a megnövekedett transzfer frekvencia által biztosított előny miatt (Carraro és mtsai, 2017a).

## **2.4. Az IncA/C plazmidok mesterregulátora: az FlhDC homológ AcaCD**

Az FlhDC családba tartozó regulátorokat elsőként a bakteriális flagelláris operonok aktivátoraiként azonosították, később kiderült, hogy számos konjugatív plazmidban és ICE-ben a transzfer apparátus szabályozójaként is szerepelnek. A flagelláris rendszerekben a szabályozott operonok hálózata (regulon) több, mint 60 gént tartalmaz, amelyek hierarchikusan expresszálódnak három promóter osztály alapján. A hierarchia csúcsán az FlhD és FlhC fehérjéket kódoló operon áll (Singer és mtsai, 2013). Szignálok különböző sejtes hálózatokból (HNS, OmpR, CRP, UmoABCD, Lrp) jelzik a sejt metabolikus állapotát és indukálják vagy gátolják az *flhDC* expresszióját (Claret és Hughes, 2000; Singer és mtsai, 2013). Az FlhD és az FlhC fehérjék egy heterohexamer komplexet alkotnak (FlhD<sub>4</sub>C<sub>2</sub>), amely a hierarchia második szintjén lévő operonok transzkripcióját indukálja (Singer és mtsai, 2013). Az FlhDC a transzkripció aktiválása során egyrészt kötődik az általa felismert kötőhelyekhez, másrészt a  $\sigma^{70}$  faktort tartalmazó RNS polimeráz  $\alpha$ -alegységének C-terminális doménjével kapcsolódik (Fitzgerald és mtsai, 2014).

A hierarchia második szintjén lévő operonok fontos szabályozó faktorokat kódolnak (pl. FlhA és FlgM), illetve biztosítják többek között a flagelláris rendszer alapi testének strukturális komponenseit. A harmadik szinten szabályozódnak a flagelláris rendszer összeszerelésének késői fázisában szükséges faktorok, mint pl. a flagelláris filamentum (flagellin) alegységei, a motor komponensei és a kemotaxis szabályozó faktorok (Fitzgerald és mtsai, 2014).

Az FlhDC regulátorok távolabbi rokonait megtalálták SXT/R391 ICE-kben (SetCD) és IncA/C plazmidokban (AcaCD) (Carraro és mtsai, 2014a). Maguk az aktivátorok is szabályozódnak, de nem teljesen ismert, hogy milyen szignálok befolyásolják expressziójukat. Az SXT *setCD* génjeit a  $\lambda$  cI-szerű SetR represszor szabályozza, amely a DNS sérülését érzékeli (Beaber és mtsai, 2004; Carraro és mtsai, 2014a). Az IncA/C plazmidokban egy Ner-

szerű és egy H-NS-szerű represszor (Acr1 és Acr2) hat az AcaCD expressziójára (Carraro és mtsai, 2014a).

Az SXT és IncA/C családok konjugatív rendszereinek szabályozási mechanizmusa, sőt a gének elrendeződése is hasonló, de a SetCD és AcaCD által felismert DNS motívumok nem azonosak egymással, sem a flagelláris rendszerek azonos funkciójú motívumaival (Beaber és mtsai, 2004; Wozniak és Hughes, 2008; Carraro és mtsai, 2014a). Érdekesség, hogy az SXT/R391 ICE-kben a SetCD nemcsak a konjugatív regulont, hanem az *int* és *xis* gének expresszióját is indukálja, amelyek a kivágódás és integráció folyamatát bonyolítják (Burrus és Waldor, 2003; Poulin-Laprade és mtsai, 2015b).

Az IncA/C plazmidokban az AcaCD fehérjék 18 promótert aktiválnak, amelyek jelentős része a konjugatív transzferhez szükséges gének és operonok (T4SS komponenseit kódoló gének - *traLEKB*, *traVA*, *dsbC/traC/trhF/traWU*, *traFHG*, továbbá a „párosodást stabilizáló” (*mating pair stabilization*) gén - *traN*, a relaxáz és a T4CP - *traIDJ*), valamint ismeretlen funkciójú, feltehetőleg „*mating*” gének expresszióját is szabályozzák (Carraro és mtsai, 2014a; Guglielmini és mtsai, 2014; Poulin-Laprade és mtsai, 2015a). A promóterek szekvenciája egy 28 bp-os konszenzus szekvenciával volt jellemezhető, melyek feltehetőleg AcaCD fehérjék kötőhelyeiként szolgálnak (Carraro és mtsai, 2014a).

Az AcaCD a plazmid saját transzfer génjei mellett az IncA/C plazmidok által mobilizálható GI-k *xis* génjét, valamint *tra* génjeit is aktiválja (pl. MGIV*ch*Hai6 és SGI1), ami elősegíti a GI kivágódását és azt követő transzferét (Carraro és mtsai, 2014a, 2015a; Kiss és mtsai, 2015; Carraro és mtsai, 2016). Az IncC plazmid eredetű konszenzus szekvenciát felhasználva az SGI1-en 5 feltételezett AcaCD kötőhelyet azonosítottak a *xis*, az S004, az S005 (*traN*), az S012 (*traH*) és az S018 gének promóter régióiban (Carraro és mtsai, 2014a).

## **2.5. Az SGI1 és az IncA/C plazmidok stabilitását biztosító rendszerek**

Az IncA/C plazmidok stabilitását elsősorban saját replikációs rendszerük, míg az SGI1 stabilitását a kromoszómára való integráció biztosítja. Emellett azonban egyéb funkciók is hozzájárulnak stabilitásukhoz

### **2.5.1. Partíciós rendszerek**

A nagyméretű, alacsony kópiaszámú plazmidok stabil fennmaradását a bakteriális kromoszómákhoz hasonlóan Par rendszerek biztosítják, amelyek a plazmidokat pozícionálják

a baktériumsejteken belül a sejtosztódás során (Baxter és Funnell, 2014; Brooks és Hwang, 2017). A Par rendszerek a plazmidok stabilitásának egyik legmeghatározóbb elemei (Baxter és Funnell, 2014).

A Par rendszerek általánosan három komponensből állnak: egy centromer-szerű szekvenciából (*cisz*-aktív elem), amit partíciós helynek (*partition site*, *par*) nevezünk, egy *par* szekvenciát kötő ParB fehérjéből (*centromere binding protein*, CBP), és egy ParA (nukleozid trifoszfátáz, NTPáz) fehérjéből (Gerdes és mtsai, 2002; Baxter és Funnell, 2014; Hancock és mtsai, 2016).

A rendszer elemei általában egy operonon belül kódolódnak és a fehérjék mennyisége autoreguláció útján szabályozódik. Ilyenkor a CBP fehérje represszor funkcióval is rendelkezik, így a *par* helyek rendszerint átfedőek a *par* operon promóterével. Ezen kívül a *par* helyek a Par fehérjéket kódoló gének után vagy az operon promóteréhez közeli *upstream* pozícióban, vagy akár az operontól távolabb, a plazmid különböző pontjain is elhelyezkedhetnek. A *par* helyek szekvenciája és szerveződése igen változatos (Baxter és Funnell, 2014).

Az SXT/R391 ICE-k és IncA/C plazmidok egy ParMRC-szerű SrpMRC partíciós rendszerrel rendelkeznek, amelyet a SetDC, illetve az AcaCD transzkripciószabályozók szabályoznak. Emellett az IncA/C plazmidok egy ParABC rendszert is hordoznak, ez azonban valószínűleg nem áll az AcaCD szabályozása alatt (Hancock és mtsai, 2016; Carraro és mtsai, 2015b). A ParA fehérje hasonlít az IncP plazmidokéhoz, míg a ParB fehérje ParB és KorB doméneket egyaránt tartalmaz (Hancock és mtsai, 2016). A KorB fehérjék általában nem csupán a kromoszóma szegregációjában töltenek be fontos szerepet, hanem replikációs és konjugatív transzfer gének szabályozásában is részt vesznek (Bignell és Thomas, 2001).

IME-kben eddig nem azonosítottak funkcionálisan működő Par rendszereket.

### **2.5.2. Toxin-antitoxin rendszerek**

A TA rendszerek szintén hozzájárulnak a MGE-k stabil fenntartásához az elemet nem tartalmazó leánysejt növekedésének vagy osztódásának gátlásával. A TA gének minden esetben egy toxint és egy antitoxint kódolnak (Hernández-Arriaga és mtsai, 2014). A toxin gátolhatja a sejtosztódást vagy a baktériumsejt fennmaradását, míg az antitoxin gátolja a toxin hatását. A toxin mindig egy stabil fehérje, míg az antitoxinok kevésbé stabil fehérjék vagy szabályozó RNS-ek is lehetnek. A toxin és antitoxin eltérő stabilitása fontos szerepet játszik a TA rendszerek működésében (Hernández-Arriaga és mtsai, 2014).

A TA rendszereket először alacsony kópiaszámú plazmidokon azonosították, de napjainkban egyre több mobilis elemen, többek között ICE-ken is találunk aktív TA rendszereket (Wozniak és Waldor, 2009; Carraro és mtsai, 2015b). Az IncA/C plazmidokon is feltételeznek egy stabilizáló rendszert, amelynek tagjai az N15 fág TA rendszerének Gp48 és Gp49 fehérjéire hasonlítanak, azonban ezt eddig nem tanulmányozták részletesebben (Hancock és mtsai, 2016). Az SGI1-en is azonosítottak egy TA rendszert (SgiAT), amelynek fehérjéit az S026-S025 génekből álló operon kódolja (Huguet és mtsai, 2016). Az S025 egy, a szubtilizin szerin proteázokkal hasonlóságot mutató toxint kódol, míg az S026 az AAA-ATPáz család fehérjéivel rokon antitoxint. Az SgiAT rendszere nem járul hozzá a kromoszómába integrált SGI1 fennmaradásához (Kiss és mtsai, 2012), de a kivágódott sziget stabilizálásában fontos szerepe lehet, mivel IncC *helper* jelenlétében az SGI1 stabilitását a TA rendszer jelentősen növeli (Huguet és mtsai, 2016).

### 2.5.3. Entry exclusion

Az *entry exclusion* (Eex) lényege, hogy a DNS transzlokáció gátolt azok között a sejtek között, amelyek azonos vagy nagyon hasonló plazmidokat hordoznak (Humbert és mtsai, 2019). Az Eex-et F-szerű konjugatív plazmidokon (Audette és mtsai, 2007), IncHI1 (Gunton és mtsai, 2008), IncI1/IncI $\gamma$  (Sakuma és mtsai, 2013), IncN/IncW (Bolland és mtsai, 1990; Pohlman és mtsai, 1994) és IncP $\alpha$  inkompatibilitási csoportokba tartozó plazmidokon (Haase és mtsai, 1996), illetve az SXT/R391 család elemei esetében vizsgálták (Marrero és Waldor, 2005). F-szerű plazmidok és SXT/R391 ICE-k esetében a donor membránjában lokalizált TraG fehérje felismeri a plazmid/ICE által kódolt Eex fehérjét (TraS), ami a plazmidot/ICE-t már hordozó recipiens sejt membránjában lokalizált, s ezáltal gátolja a plazmid/ICE átjutását (Marrero és Waldor, 2005; Audette és mtsai, 2007).

Az IncA és az IncC plazmidok replikációs rendszereik alapján nem mutatnak inkompatibilitást, transzformálást követően stabilan fenntarthatók együtt, azonban a két csoport plazmidjai között az Eex jelensége megfigyelhető, ezért is sorolták régebben egy inkompatibilitási csoportba őket (Ambrose és mtsai, 2018). Az IncA/C plazmidok esetén az Eex során a donor TraG fehérje ismeri fel a recipiens EexC fehérjét és ezáltal gátolja a két sejt közötti DNS átvitelt (Humbert és mtsai, 2019). Kimutatták, hogy az EexC fehérje, amelyet a *traG*-tól *downstream* elhelyezkedő konzervált kis ORF kódol, nem tud kapcsolódni az SGI1 által expresszált TraG-hez, így az SGI1 jelenlétében az Eex nem érvényesül (Humbert és mtsai, 2019).



## 2.6. Kutatási előzmények

Az SGI1 konjugatív transzferének feltétele a sziget kromoszómáról történő kivágódása, amelyért a  $\lambda$  integráz családba tartozó helyspecifikus rekombinációs rendszer felelős. Az Int által katalizált helyspecifikus rekombináció az Xis jelenlétében a kivágódás irányába tolódik el, azaz a kivágódáshoz a Xis expressziója szükséges. Az *int* és *xis* gének promóterét ( $P_{int}$  és  $P_{xis}$ ) és a transzkripció starthelyét (TSS) is meghatároztuk és kimutattuk, hogy a  $P_{int}$  konstitutív, míg a  $P_{xis}$ -t az IncA/C *helper* plazmidok által kódolt AcaCD aktivátor szabályozza. Aktivátor hiányában  $P_{xis}$  lényegében nem működik. *Band shift* kísérletekkel igazoltuk az AcaCD kötődését a promóter régióhoz és *footprint* analízissel (*DNaseI footprinting*) pozícionáltuk az AcaCD pontos kötőhelyét (Kiss és mtsai, 2015).

Azonosítottuk az SGI1 transzfer iniciációjában résztvevő *cis*-elemet, azaz az *oriT* régiót, illetve két mobilizációs gént, az *mpsA*-t (S020) és *mpsB*-t (S019). Kimutattuk, hogy az SGI1 transzfer iniciációjához az IncA/C plazmidok relaxáza nem szükséges, bár a transzfer hatékonyságát növeli (Kiss és mtsai, 2019).

Az IncA/C plazmidok *oriT* régióját szintén feltérképeztük, és azonosítottunk a *mobI* gént, amely az *oriT* régiótól *downstream* helyezkedik el, a plazmid transzferéhez nélkülözhetetlen, míg az SG1 transzferét nem befolyásolja (Hegyi és mtsai, 2017).

## II. Célkitűzések

Kutatócsoportunk az SGI1 és IncC plazmidok közötti bonyolult molekuláris kapcsolatrendszer feltérképezését és eddig ismeretlen funkciójú gének azonosítását és funkcióinak felderítését tűzte ki célul.

Doktori tanulmányaim során e projekt részeként az alábbi célokat tűztük ki:

- 1) az SGI1 kivágódás feltételeinek és az IncC *helper* plazmid ebben játszott szerepének meghatározása,
- 2) az SGI1-IncC rendszerben azonosított FlhDC homológ regulátorok (AcaCD és FlhDC<sub>SGI1</sub>) aktivitásának vizsgálata,
- 3) az SGI1-en prediktált AcaCD-reszponzív promóterek jellemzése,
- 4) az SGI1 és IncC plazmidok egymással szemben tapasztalható destabilizáló hatás (inkompatibilitás) nem azonosított faktorainak a feltérképezése és analízise.

### III. Anyagok és módszerek

A standard DNS technikákat és molekuláris biológiai eljárásokat Sambrook és mtsai munkája alapján kiviteleztuk (Sambrook és mtsai, 1989).

#### 1. Baktérium törzsek, tápoldatok, antibiotikumok, enzimek és vegyszerek

A felhasznált baktérium törzsek teljes listája a **Melléklet 1**-ben található. A baktériumokat általánosan Luria médiumban (*Luria broth*, LB) vagy LB agaron (LA) növesztettük. Az antibiotikumokat a következő koncentrációban használtuk: ampicillin (Ap) 150 µg/ml, kloramfenikol (Cm) 20 µg/ml, kanamycin (Km) 30 µg/ml, spektinomycin (Sp) 50 µg/ml, streptomycin (Sm) 50 µg/ml, nalidixinsav (Nal) 20 µg/ml, gentamycin (Gm) 25 µg/ml, tetraciklin (Tc) 10 µg/ml.

A restrikciós endonukleázokat a Thermo Fisher Scientific-től és a NEB-től vásároltuk. A NEBNext® End Repair kit-et a NEB-től vásároltuk. A DreamTaq™ polimerázt, T4 DNS ligázt, Klenow-polimerázt és egyéb molekuláris biológiában használt enzimeket, puffereket a Thermo Fisher Scientific-től vásároltuk. A Pwo polimerázt a Roche-től szereztük be. A genomi DNS (gDNS) és plazmid izolálásához a Qiagen termékeit használtuk a gyártó ajánlása szerint. Az RNáz-mentes DNázI-et a Qiagen-től vásároltuk.

#### 2. DNS emésztés restrikciós endonukleázokkal

A DNS emésztések reakcióelegyét 20 µl végtérfogatba mértük össze, amelyhez restrikciós endonukleázokból rendszerint 5 unitot, a megfelelő pufferből 1× mennyiséget, 2-5 µl plazmid DNS-t (~200-500 µg/ml) és MilliQ vízzel egészítettük ki. A reakcióelegyet másfél órán keresztül inkubáltuk az enzim optimális hőmérsékletén. Az emésztéseket az inkubáció után gélelektroforézissel ellenőriztuk a reakcióelegy 5 µl-ének felhasználásával.

#### 3. Plazmid konstrukciók

A plazmidok teljes listája a **Melléklet 2**-ben található. A plazmidok részletes leírása a **Melléklet 3**-ban olvasható.

#### 4. Polimeráz láncreakció (PCR) és primerek

A polimeráz láncreakciót (*polymerase chain reaction*, PCR) 25 µl végtérfogatban végeztük, amelyben 0,2-0,2 µM primert, 0,2 mM dNTP-t, 2 mM MgCl<sub>2</sub>-t, 1× DreamTaq puffert és 0,5 µl DreamTaq™ polimerázt, illetve megfelelő mennyiségű gDNS-t, plazmidot vagy baktérium szuszpenziót (kolónia PCR esetén) mértünk össze reakciónként.

Kolónia PCR-hoz templátként a telepeket 100 µl 0,9% NaCl oldatban szuszpendáltuk, amelyből 2 µl-t használtunk egy reakcióhoz, vagy az LB-ben felnőtt baktérium szuszpenzióból 2 µl-t mértünk a reakcióhoz. Génkiütéshez használt PCR termék amplifikálásakor a reakciómixhez 0,1 µl *proofreading* aktivitással rendelkező Pwo polimerázt is adtunk. A klónozásra szánt amplikonokat Pwo vagy Phusion polimerázzal készítettük és minden esetben a klónozást követően szekvenáltuk.

A PCR paraméterei a következők voltak DreamTaq™ és Pwo polimerázok használatával: **1)** templát denaturáció 94°C 2 perc, **2)** 35 ciklus: denaturáció 94°C 20 másodperc, primerek csatolása 55°C 30 másodperc, elongáció (72°C, a várt termék méretétől függően így 1-2 perc, 1 perc/kb), **3)** terminális extenzió 72°C 5 perc. A PCR termékek tisztítása további felhasználás céljából etanolos precipitációval történt. Phusion polimeráz használatával az elongációs időt rövidítettük a gyártó ajánlása szerint (30 másodperc/kb). A primerek a **Mel-léklet 4**-ben vannak felsorolva. Az SGI1-hez csatoló primerek tervezéséhez az SGI1 referencia szekvenciáját (GenBank: AF261825) használtuk. A génkiütéshez használt primerek tervezéséhez az SGI1 referencia szekvenciát és a pKD3 templát plazmid szekvenciáját használtuk (Datsenko és Wanner, 2000). A TSS meghatározásához a pUCfor21 primert használtuk (Kiss és Olasz, 1999). Az SGI1 kivágódásának és az SGI1 integrált formájának detektálásához az LJ2-RJ2/RJ4 (*attP*, 827/594 bp), attsgi1for-attsgi1rev (*attB*<sub>Ec</sub>, 391 bp) és RJ2-attsgi1rev (DRR<sub>Ec</sub>, 508 bp) primerpárokat használtuk.

#### 5. Elektrokompetens sejtek készítése egy lépéses géninaktivációhoz, elektroporáció

Az éjszakán át (*overnight*, ON) felnövesztett baktérium kultúrákat 50× hígítottuk 20 ml végtérfogatú LB+antibiotikum tápoldatban, majd inkubáltuk OD<sub>600</sub>~0,5-ig. Arabinóz hozzáadása után (végkoncentráció 1%), amely a pKD46-ról a λ Red rekombináz expresszió indukciójához szükséges, a baktériumokat még 1 órán keresztül inkubáltuk 30°C-on. Az inkubáció után minden folyamat 4°C-on történt az elektroporációig. Az elektrokompetens sejteket az alábbi protokoll szerint készítettük:

1. Centrifugálás (5000 rpm, 10 perc).
2. Felülúszó leöntése, pellet reszuszpenziója 20 ml 4°C-os MilliQ vízben. (2×)
3. Centrifugálás (6000 rpm, 10 perc). (2×)
4. Felülúszó leöntése, pellet reszuszpenziója 2 ml 4°C-os 10%-os glicerín oldattal.
5. Centrifugálás (8000 rpm, 10 perc).
6. Felülúszó leöntése, pellet reszuszpenziója 120 µl 4°C-os 10%-os glicerín oldattal.

Az így elkészített elektrokompetens sejtekből elektroporációnként 40 µl-t használtunk fel. A PCR termékeket alkoholos kicsapással tisztítottuk, majd 20 µl MilliQ vízben feloldottuk. A kompetens sejtekhez elektroporáció előtt 5-5 µl tisztított PCR terméket adtunk.

Az elektroporációhoz BTX Electro Cell Manipulator 600 gépet használtunk (25 µF, 129 Ω, 12,5 kV/cm 0,2 cm-es küvettákkal).

## 6. Egylépéses géninaktiváció

A génkiütéseket Datsenko és Wanner módszere szerint végeztük (Datsenko és Wanner, 2000). A génkiütő (*knock-out*, KO) primerek 60-70 bp hosszúak, 5' részük (40-50 bp) a KO gént határoló szekvenciával, míg 3' végük (20-23 bp) a templátként használt, antibiotikum rezisztenciát kódoló plazmidok meghatározott (a rezisztenciagénnel határos) DNS szakaszával homológ (1. táblázat).

A KO PCR termékek előállításához templát plazmidként R6K-alapú pKD3 (CmR) plazmidot használtuk, amely *pir* gént nem hordozó törzsben nem képes replikációra, így az elektrotranszformálás során csak a rekombinánsok képeznek telepet a szelektív lemezeken.

A λ Red rekombinázt termelő pKD46 plazmidot (ApR) a génkiütést megelőzően *E. coli* TG1Nal::SGI1-C törzsbe transzformáltuk. A pKD46-ot tartalmazó törzset a plazmid termoszenzitív replikációs rendszere miatt 30°C-on növesztettük.

Az *E. coli* TG1Nal::SGI1-C/pKD46 törzsből arabinózos indukciót követően (λ Red rekombinázt expressziójának indukciója) elektrokompetens sejteket készítettünk, majd a tisztított PCR termékek hozzáadása után elektroporáltuk a sejteket (ld. III/5.).

Az elektroporáció után a baktériumokat SOC médiumban (Sambrook és mtsai, 1989) 1 órán keresztül inkubáltuk, majd a szuszpenziót centrifugáltuk. A pellet SOC médiummal való reszuszpendálása (100 µl) után a baktériumokat szelektív (LA+Cm) lemezekre szélesztettük, amelyeket 30°C-on növesztettük 24-48 órán keresztül. Az így nyert CmR telepeket szelektív LA lemezekre szélesztve 42°C-on növesztettük, amivel a termoszenzitív pKD46 plazmidot nagy valószínűséggel elimináltuk. A pKD46 plazmid el-

vesztéséről az egyes telepek fenntartó (LA+Cm, 37°C) és tesztelő (LA+Ap, 30°C) lemezekre való átszűrésével bizonyosodtunk meg.

Jelölés	KO régió	KO primerpár	Tesztelő primerpárok
$\Delta$ bind site	P <sub>xis</sub> -AcaCD kötőhely és <i>upstream</i> régió	pxisdelfor1-pxisdelrev	pxisseqfor-cateco/cat5 pxisseqrev-catfor/cat3.2 pxisseqfor-pxisseqrev S003for2-pxisseqrev (-)
$\Delta$ upstream	P <sub>xis</sub> - <i>upstream</i> régió	pxisdelfor2-pxisdelrev	pxisseqfor-cateco/cat5 pxisseqrev-catfor/cat3.2 pxisseqfor-pxisseqrev S003for2-pxisseqrev (-)
$\Delta$ S003	S003 (repA)	003delfor-003delrev	S003for2-cateco/cat5 d003seqrev-catfor/cat3.2 S003for2-d003seqrev pxisseqfor-pxisseqrev(-)
$\Delta$ S003-S005	S003-S005	003delfor-005delrev	S003for2-cateco/cat5 d005seqrev-catfor/cat3.2 S003for-d005seqrev pxisseqfor-pxisseqrev(-) d006seqfor-d005seqrev(-)
$\Delta$ S006-S007	S006-S007	006delfor-007delrev	d006seqfor-cateco/cat5 d007seqrev-catfor/cat3.2 d006seqfor-d007seqrev d006seqfor-d005seqrev(-)
$\Delta$ S006-S012	S006-S012	006delfor-012delrev	d006seqfor-cateco/cat5 d012seqrev-catfor/cat3.2 d006seqfor-d012seqrev d006seqfor-d005seqrev(-)
$\Delta$ S013-S018	S013-S018	013delfor-018delrev	d013seqfor-cateco/cat5 S019rev2-catfor/cat3.2 d013seqfor-S019rev2 S020for1/2/3-S019rev2(-)
$\Delta$ S023-S026	S023-S026	023delfor-026delrev	S022promfor-cateco/cat5 d026seqrev-catfor/cat3.2 S022promfor-d026seqrev sgi1S025rev-sgi1S026for(-)
$\Delta$ S023-S027	S023-S027	023delfor-027delrev	S022promfor-cateco/cat5 d027seqrev-catfor/cat3.2 S022promfor-d027seqrev sgi1S025rev-sgi1S026for(-)
$\Delta$ S044	S044	044delfor-minidelrev	d044seqfor-catfor/cat3.2 cateco/cat5-attsgi1rev d044seqfor-d043seqrev(-)
$\Delta$ S004	S004	004delrev-004delfor	d004seqfor-sgi1seq1rev d004seqfor-cateco/cat5 sgi1seq1rev-catfor/cat3.2
$\Delta$ S003-S004	S003-S004	003delfor-004delrev	S003for2-cateco/cat5 sgi1seq1rev-catfor/cat3.2 S003for2-sgi1seq1rev
$\Delta$ S004-S005	S004-S005	004delfor-005delrev	d005seqrev-catfor/cat3.2 d004seqfor-cateco/cat5 d004seqfor-d005seqrev

**1. táblázat** Egylépéses géninaktivációval generált SGI1 deléciós mutánsok és a kiütéshez, illetve teszteléshez használt primerek listája.

A KO primerekkel pKD3 templát plazmidről amplifikált PCR termékeket rekombináztattuk TG1Nal::SGI1-C vad típusú (wt, *wild type*) törzsbe a pKD46 plazmidről termeltetett  $\lambda$  Red rekombináz segítségével. A tesztelő primerekkel a létrehozott deléciók végpontjait teszteltük a pKD3 eredetű CmR-hez csatoló belső primerek (*downstream*: cateco, cat5; *upstream*: catfor/cat3.2) és a delécióknak megfelelő külső primerek (for/rev) segítségével. A CmR kazetta pCP20 plazmid általi eliminációját követően a deléciókat a megfelelő külső primerekkel, illetve a deléciók zöménél a kiütött régióhoz csatoló negatív kontrollnak használt primerpárokkal (-) tudtuk tesztelni.

Mivel a pKD46 plazmidon a rezisztenciagének határoló régiójában egy-egy FRT rekombinációs hely található, így a rezisztenciagén eltávolításához az FRT/Flp helyspecifikus rekombinációs rendszert használtuk. A CmR gént hordozó *E. coli* TG1Nal::SGI1-C $\Delta$ mutáns (NalR SmR SpR, CmR) törzseket az Flp rekombinázt termelő termoszenzitív pCP20 plazmiddal (ApR) transzformáltuk. A 30°C-on felnőtt telepeket egyes telepre szélesztettük LA lemezre, majd 42°C-on inkubáltuk, amivel egyrészt az Flp rekombinázt termelését indukáltuk, másrészt nagy valószínűséggel elimináltuk a pCP20 plazmidot. A rezisztenciagén (CmR) és a pCP20 plazmid elvesztéséről az egyes telepek fenntartó (LA, 37°C) és tesztelő (LA+Cm, 37°C; illetve LA+Ap, 30°C) lemezekre való átszűrésével bizonyosodtunk meg.

Az elkészült deléciós mutánsokat az érintett DNS szakaszokra specifikus PCR tesztekkel (1. táblázat), illetve egyes esetekben az amplikon szekvenálásával igazoltuk.

## **7. Konjugációs tesztek**

150-150  $\mu$ l szelektív LB-ben növesztett stacioner fázisban lévő donor és recipiens baktériumszuszpenziót kevertünk össze, centrifugáltuk (1 perc, 16000 rcf), majd kétszer mostuk 0,5 ml 0,9%-os NaCl oldattal.

A baktérium elegyet szélesztettük LA lemezekre, majd inkubáltuk 6 órán keresztül vagy ON 37°C-on. Az LA lemezről a baktériumokat 4 ml 0,9%-os NaCl oldattal szuszpendáltuk, majd titrálási sort készítettünk ( $1 \cdot 10^7 \times$  hígítás) 96-lyukú lemezen.

A titrálási sorból 5-5  $\mu$ l-t cseppentettünk a szelektív LA lemezekre, amellyel meghatároztuk a donor, recipiens, SGI1 és/vagy IncA/C transzkonjugáns titereket. A konjugációs frekvenciákat mind a donor mind a recipiens titerek alapján kiszámoltuk (transzkonjugáns/donor és transzkonjugáns/recipiens). A konjugációs tesztek során 4-6 párhuzamos kísérletet végeztünk, a transzfer gyakoriságokat ezek átlagaként és átlagtól való eltéréssel (szórásával) adtuk meg.

A komplementációs tesztekhez a pJKI1038 (AcaCD-termelő), a pJKI1040 (FlhDC<sub>SGI1</sub>-termelő) és pJKI1036 (negatív kontroll) plazmidokat *E. coli* TG1Nal::SGI1-C/R16a $\Delta$ acaCD törzsbe transzformáltuk. E transzformánsokból csoportonként 5 telepet használtunk donorként az *E. coli* TG90 recipienssel való konjugációhoz.

## 8. Fehérje expresszió vizsgálata (SDS PAGE)

Az SGI1 S006 és S007 (FlhDC<sub>SGI1</sub>) és IncA/C AcaCD, illetve az SGI1 S003, S004L és S004S fehérjék detektálásához összfehérje preparátumot készítettünk indukáló és nem indukáló körülmények között. Ehhez az expressziós plazmidokat (pGMY3, pJKI878, pJKI1048, pJKI1049 és pJKI1050) *E. coli* Tuner (DE3) (Novagen) törzsbe transzformáltuk, majd 1-1 transzformáns telepől éjszakás kultúrát növesztettünk 2 ml LB+Ap (pGMY3 és pJKI878) vagy LB+Sm+Sp (pJKI1048, pJKI1049 és pJKI1050) tápoldatban. A felnőtt kultúrákból 10× hígítást készítettünk 5 ml végtérfigatban (LB+Ap vagy LB+Sm+Sp) és 1 óra növesztés után a mintákat kettéosztottuk, az egyik mintához 0,5 mM IPTG-t adtunk és a tenyészeteket további 3 órán keresztül inkubáltuk 37°C-on rázatva. Végül a sejteket centrifugálás után SDS mintapufferben lizáltuk (Sambrook és mtsai, 1989) és a mintákat 12,5%-os (S003, S006, S007, AcaC és AcaD) vagy 15%-os (S004L és S004S) SDS PAGE gélen futtattuk.

## 9. Növekedési görbe felvétele

*E. coli* TG1Nal törzsbe transzformáltuk a pJKI1048, pJKI1049, pJKI1050 és pGMY8 plazmidokat, majd 6-6 transzformáns telepet ON felnövesztettünk 2 ml LB+Sm+Sp-ben. A felnőtt kultúrákat 200× hígítottuk 12 ml LB+Sm+Sp+0,05 mM IPTG-ben (kb. 10<sup>7</sup> sejt/ml), majd 37°C-on rázás mellett növesztettük és 30 percenként rögzítettük az OD<sub>600</sub> értéket.

## 10. β-galaktozidáz mérések

A β-galaktozidáz méréseket promóter aktivitás mérésekhez használtuk. Ehhez a vizsgálni kívánt promóter régiókat klónoztuk a *lacZ* gén elé (Melléklet 2, 3). Az így kapott mérőplazmidokat (pJKI1003, pJKI1013, pJKI1014, pJKI1016, pMSZ965, pMSZ953, pMSZ954 és pMSZ955) transzformáltuk olyan *E. coli* TG1 törzsekbe, amelyek már tartalmazták az aktivátorokat (AcaCD, illetve FlhDC<sub>SGI1</sub>) expresszázó plazmidokat (pJKI888, illetve pGMY6), vagy a negatív kontrollként szolgáló vektort (pJKI88).

A β-galaktozidáz méréseket kisebb módosítással J. H. Miller protokollja szerint végeztük (Miller, 1972). A β-galaktozidáz mérésekhez a baktériumokat ON növesztettük LB+Km+Ap táplevesben. Az ON kultúrákat 40× hígítottuk 10 ml LB+Km+Ap+0,05 mM



IPTG-ben, majd kb. 2 órás ( $OD_{600} \sim 0,3-0,4$ ) 37°C-os növesztést követően jégre helyeztük őket. 20 perc elteltével az  $OD_{600}$  értékeket rögzítettük.

Ezt követően minden baktériumlé 0,5 ml-hez hozzáadtunk 0,5 ml Z puffert (0,06 M  $Na_2HPO_4 \times 7 H_2O$ , 0,04 M  $NaH_2PO_4 \times H_2O$ , 0,01 M KCl, 0,001 M  $MgSO_4$ , 0,05 M  $\beta$ -merkaptóetanol, pH=7), 20  $\mu$ l kloroformot és 10  $\mu$ l 0,1% SDS-t. Az összemért elegyet vortex-szel kevertük, majd 10 percig szobahőmérsékleten hagytuk a kloroformot elpárologni. A reakcióelegyhez hozzáadtunk 200  $\mu$ l ONPG oldatot (4 mg/ml 0,1M foszfát pufferben, pH=7) és 28°C-os vízfürdőben inkubáltuk a mintákat 1 órán keresztül. A reakció kezdő ( $t_0$ ) és végső időpontját ( $t$ ) rögzítettük. Az inkubáció után a reakciót 500  $\mu$ l 3M  $NaCO_3$ -tal állítottuk le, majd az  $OD_{550}$  és  $OD_{420}$  értékeket rögzítettük. A  $\beta$ -galaktozidáz aktivitást (unit/U) a következő formula alapján számoltuk, ahol 1 unit megfelel 1  $\mu$ mol/perc ONPG elbontásának 28°C-on:

$$U = \frac{1000 \times (OD_{420} - 1,75 \times OD_{550})}{\Delta t \times v \times OD_{600}}, \text{ ahol } \Delta t = t - t_0 \text{ és } v = \text{reakció végtérfogat (1,71 ml)}$$

## 11. Primer extenziós analízis

Az AcaCD-függő promótereket hordozó mérőplazmidokat (pMSZ965[P<sub>S004</sub>], pMSZ953[P<sub>S005</sub>], pMSZ954[P<sub>S012</sub>], pMSZ955[P<sub>S018</sub>]), valamint AcaCD-t expresszáló (pJKI888) vagy nem expresszáló (pJKI88, negatív kontroll) plazmidot tartalmazó *E. coli* TG90 baktériumtörzsekből RNS-t izoláltunk. Ehhez az LB+Km+Ap-ben 37°C-on növesztett ON kultúrákat 1000× hígítás után 10 ml LB-ben antibiotikum szelekció nélkül  $OD_{600} \sim 0,5$ -ig növesztettük, majd a sejtekből 2,5 ml-t centrifugáltunk és lefagyasztottuk folyékony nitrogénben. A lefagyasztott pillethez 750  $\mu$ l lízis puffert adtunk (0,2 M Na-acetát pH=5,2, 1% SDS, 10 mM EDTA), vortex-szel felszuszpendáltuk a sejteket, majd az elegyet 2 percen keresztül forraltuk és 2 percig intenzíven újra kevertük vortex-szel. A lizátumokat centrifugáltuk (20 perc, 16000 rcf, 4°C). A felülúszóhoz 750  $\mu$ l fenolt adtunk és újra centrifugáltuk (10 perc, 16000 rcf, 4°C). Ezt a lépést kétszer megismételtük először 720  $\mu$ l 1:1 arányú fenol:kloroform elegy, majd 360  $\mu$ l kloroform hozzáadásával. Az RNS kicsapásához 600  $\mu$ l-nyi felülúszóhoz 200  $\mu$ l 10 M LiCl adtunk, az elegyet 1 órán keresztül jégen inkubáltuk, végül centrifugáltuk (10 perc, 16000 rcf, 4°C). A pelletet először 2,5 M LiCl-dal, majd 70%-os etanollal mostuk. Centrifugálásokat követően (10, majd 5 perc, 16000 rcf, 4°C) a pelletet beszárítottuk és 50  $\mu$ l RNáz-mentes vízben feloldottuk.

A kivont RNS-ből 20 µl-t (~10 µg) emésztettünk 50 unit RNáz-mentes DNázi enzimmel (Qiagen) 50 µl végtérfogóban (10 perc, 37°C), majd az enzimet inaktiváltuk (10 perc, 65°C). A reakció keveréket 1:1 arányú fenol:kloroform eleggyel tisztítottuk, abszolút alkohollal az RNS-t kicsaptuk, majd kétszer mostuk 70%-os etanollal és végül szárítás után feloldottuk 20 µl RNáz-mentes vízben. Az RNS koncentrációt 0,5 µg/µl-re állítottuk be, amihez NanoDrop1000 Spektrofotométert használtunk (Thermo Scientific). Az RNS minták minőségét TAE (Tris-acetát-EDTA) agaróz gélen ellenőriztük (minden mintából 1 µg-ot futtattunk 1%-os gélen).

A primer extenziós analízist RevertAid H Minus first strand cDNA synthesis kit-tel végeztük (Fermentas). 1 µl pUCfor21 primer-t (10 µM) 50µCi [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] dATP-vel végjelöltünk 10 unit polinukleotid kinázzal (Fermentas) 10 µl végtérfogóban (45 perc, 37°C), majd az enzimet inaktiváltuk (10 perc, 68°C). Megközelítőleg 5 µg totál RNS-t és 2 pmol jelölt primert összemértünk, majd felmelegítettük 70°C-ra 5 percig. Az extenziós reakciókat RT puffer (50 mM Tris-HCl [pH=8,3], 50 mM KCl, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT), 1 mM dNTP, 20 unit RiboLock ribonukleáz inhibitor és 200 unit RevertAid reverz transzkriptáz hozzáadásával 20 µl végtérfogóban (42°C, 60 perc) végeztük. Ezt követően a mintákat 5 percig 70°C tartottuk, hogy a reakciót leállítsuk. Az extenziós termékeket etanollal kicsaptuk és 3 µl RNáz-mentes vízben oldottuk fel, majd hozzáadtunk 2 µl stop puffert (95% formamid, 20 mM EDTA, 0,05% brómfenolkék, 0,05% xilencianol).

A szekvenáláshoz 3-5 µg pMSZ965, pMSZ953, pMSZ954, pMSZ955 plazmid preparátumokat (Qiagen) használtunk. A reakciókat a dATP-vel végjelölt pUCfor21 primer és a Sequenase version 2.0 DNA sequencing kit (USB) felhasználásával mértük össze a gyártó protokollja szerint. Az extenziós és szekvenáló reakcióelegyeket 6%-os denaturáló poliakrilamid gélen futtattuk 1800V feszültséggel. A gél 3M Whatman szűrőpapírra szárítás után foszfor *screen*-re helyeztük, majd Storm 840 PhosphorImager (Amersham Biosciences) készülékkel szkenneltük.

Az extenziós kísérletek Dr. Szabó Mónika közreműködésével készültek.

## 12. Plazmid stabilitási vizsgálatok

Az R55 plazmid stabilitását a deléciós és a vad SGI1-eket hordozó törzsekben replika *plating* technikával teszteltük. Ehhez a törzseket 37°C-on ON növesztettük Nal+Sm+Sp+Cm+Km táptalajon, illetve tápoldatban, melyek az R55 és az SGI1 rezisztencia markereire egyaránt szelektívek. Ezt követően az egyes ON kultúrák 1000× hígításából 5 µl-t átoltot-

tunk 5ml LB+Nal+Sm+Sp tápoldatba, amely kizárólag az SGI1 markereire szelektív. A baktériumtenyészetek 37°C-on növesztve kb. 8 óra alatt érték el újra a stacioner fázist, amely a hígítás mértéke miatt 10 generációnak felel meg. Az így kapott kultúrákat megfelelő hígításban (kb. 500 telep legyen egy lemezen) szélesztettük LA+Nal+Sm+Sp táptalajra, majd replikáztuk LA+Nal+Sm+Sp+Cm+Km, valamint a fenntartó LA+Nal+Sm+Sp táptalajokra. A telepeket mindkét táptalajon megszámoltuk, a plazmid vesztődését az LA+Nal+Sm+Sp+Cm+Km és az LA+Nal+Sm+Sp táptalajon felnőtt telepek hányadosaként számoltuk.

A további stabilitási vizsgálatokhoz a p15a alapú, SGI1 szakaszokat tartalmazó pGMY11, pGMY14, pGMY20, pGMY28, pGMY29, pGMY32, pGMY33, pGMY34, pGMY38, pGMY39, pGMY40, pGMY41, pGMY42, pGMY43, pGMY44, pGMY47, pGMY49, pGMY50, pGMY51 és pGMY52 plazmidokat (KmR) *E. coli* TG1Nal/R55dTnSmS törzsbe (NalRCmR) transzformáltuk és ezen plazmidok jelenlétében vizsgáltuk az R55 stabilitását.

A stabilitási vizsgálatokat csekély módosítással Harmer és mtsai szerint végeztük (Harmer és mtsai, 2016). A baktériumok első ON növesztéséhez LB+Km+Cm tápoldatot használtunk, azaz az R55-re és az SGI1 szakaszokat hordozó p15a alapú plazmidok rezisztencia markereire is szelektáltunk. A passzálások során LB+Km tápoldatban növesztettük a baktériumokat, azaz csak a p15a alapú vektorra szelektáltunk. A passzálásokhoz az ON kultúrákat fiziológiás sóoldatban hígítottuk, majd a  $10^5\times$  hígításból 100-100  $\mu$ l-t adtunk 5-5 ml LB+Km tápoldathoz, így hozzávetőlegesen kb. 1000 baktériumsejtet oltottunk át alkalmanként. Mivel az ON kultúrák nagyjából  $10^9$  baktérium sejtet tartalmaznak, ezért egy passzálás kb. 20 generációnak felel meg. Az egyes passzázsokban titrálással határoztuk meg az R55 *helper* plazmidot még tartalmazó sejtek (NalRKmRCmR) és az összes sejt (NalRKmR) arányát. A mérések ismételéseinek száma minimum 3 volt.

Mivel a titrálós módszer csupán durva közelítésre alkalmas, ezért plazmidonként az 5. passzázs  $10^5\times$  hígításából 25-25  $\mu$ l-t szélesztettünk LA+Km táptalajra, majd replikáztuk LA+Km+Cm valamint a fenntartó LA+Km táptalajokra. A *helper* plazmidot még tartalmazó sejtek arányát a kétféle táptalajon számolt telepek hányadosaként határoztuk meg.

A titrálós módszert a deléciós SGI1 mutánsok jellemzésére szintén használtuk. Ebben az esetben a *helper*ként szolgáló plazmid stabilitását kb. 20-100 generáción keresztül monitoroztuk. Az 5. passzázs után replikáztunk is. Az SGI1-t tartalmazó sejtet LA+Sm+Sp, míg az R55 *helpert* is tartalmazó sejteket LA+Sm+Sp+Cm+Km táptalajon szelektáltuk.

## IV. Eredmények

### 1. SGI1 mutánsok kivágódásának és transzferének vizsgálata

Kutatásomat egy SGI1 mutánsparc létrehozásával kezdtem, amellyel olyan deléciós mutánsokat kerestünk, melyek befolyásolhatják az SGI1 kivágódását és konjugatív transzferét. A génkiütéseket SGI1-C variánsban generáltuk egy lépéses géninaktivációs módszerrel (ld. III/6.) (Datsenko és Wanner, 2000). Az SGI1-C csupán streptomycin/spektinomycin és szulfonamid rezisztenciagéneket kódol, így ez az SGI1 variáns a génkiütés során használt plazmidok rezisztencia markereivel (ApR és CmR) kompatibilis volt.

Az SGI1 *xis* génjének *upstream* régiójában ( $P_{xis}$ ) két deléciót hoztunk létre. Az egyik esetben az *upstream* régió disztális fragmentjét és az AcaCD kötőhelyet együttesen ( $\Delta$ bind site, 2306-2013 bp), míg a másik esetben csak a disztális fragmentet ( $\Delta$ upstream, 2306-2053 bp) távolítottuk el az SGI1 szekvenciából. Az utóbbi esetben az AcaCD kötőhely intakt maradt.

A replikációs funkciókat kódoló régiót egy nagyobb, a *traN* gént is érintő delécióval távolítottuk el ( $\Delta$ S003-S005, 2307-6481 bp). A *repA* gént önmagában is kiütöttük ( $\Delta$ S003, 2307-3246 bp), illetve az S004 ORF-ban is generáltunk egy kisebb deléciót ( $\Delta$ S004, 3273-3534 bp). Továbbá az S003-S004, valamint az S004-S005 géneket együttesen is eltávolítottuk ( $\Delta$ S003-S004, 2307-3534 bp és  $\Delta$ S004-S005, 3273-6481 bp).

Nagyobb deléciókat generáltunk az SGI1 gerincben, amelyekkel egyes géneket, illetve teljes operonokat eltávolítottunk. Feltételeztük, hogy a T4SS SGI1 által kódolt homológjai befolyásolhatják az SGI1 konjugációs frekvenciáját, ezért kiütöttük a T4SS-hez köthető nagyobb operont, amelyben a deléció a *traG* (S011) és *traH* (S012) gének mellett a transzkripciós aktivátorokat is érintette ( $\Delta$ S006-S012, 6484-13559 bp). A transzkripciós aktivátorokat kódoló génpárt önmagában is eltávolítottuk ( $\Delta$ S006-S007, 6484-7627 bp).

A TA rendszert (S025-S026/*sgiAT*) is érintő nagyobb deléciókat is létrehoztunk ( $\Delta$ S023-S026, 18690-25981 bp és  $\Delta$ S023-S027, 18690-26562 bp). Az S023 és S024 gének ismeretlen funkciójú gének, míg az S027 egy részolvázt kódol, amely a *res* kötőhely hiányában feltételezhetően nem funkcionális.

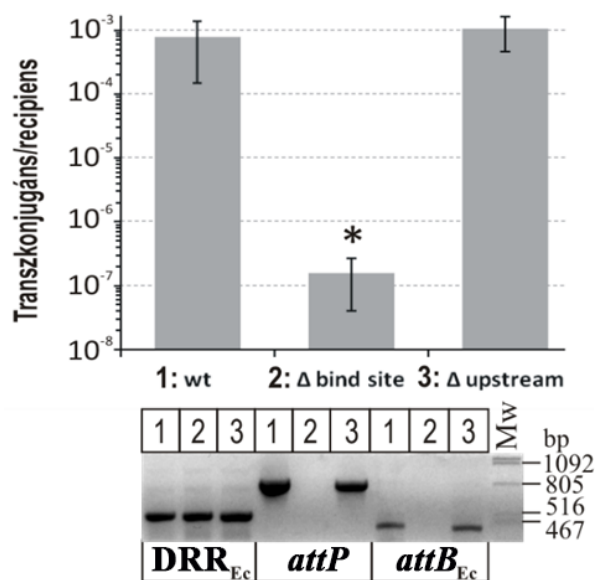
Az SGI1 számos olyan ORF-ot is hordoz, amelyeknek funkciói még ismeretlenek, így deléciós analízissel kívántuk vizsgálni ezeknek a feltételezett géneknek vagy operonoknak

( $\Delta$ S013-S018, 13513-16446 bp és  $\Delta$ S044, 41761-42469 bp) a szerepét a kivágódás és konjugáció folyamataiban.

A vad típusú (wt) és mutáns SGI1-eket hordozó baktériumtörzsekben a kivágódást a *helper* R55, valamint a pJKI828 plazmidok jelenlétében teszteltük. Ez utóbbi hordozza az R55 plazmidról származó AcaC és AcaD mesterregulátor fehérjéket kódoló teljes operont, így az aktivátorok expresszióját az operon saját promótere szabályozza. A kivágódást az SGI1 körre záródásából származtatható *attP* és a kromoszómán a „megüresedett” *attB<sub>Ec</sub>* szekvenciák PCR alapú kimutatásával, míg az SGI1 kromoszómába integrálódott formáját a DRR<sub>Ec</sub>-specifikus PCR teszttel detektáltuk (ld III/4.). A DRR szekvenciát minden esetben tudtuk amplifikálni (11. ábra), ami arra utal, hogy a baktériumpopuláció egy részében mindig jelen van az integrált genomi sziget.

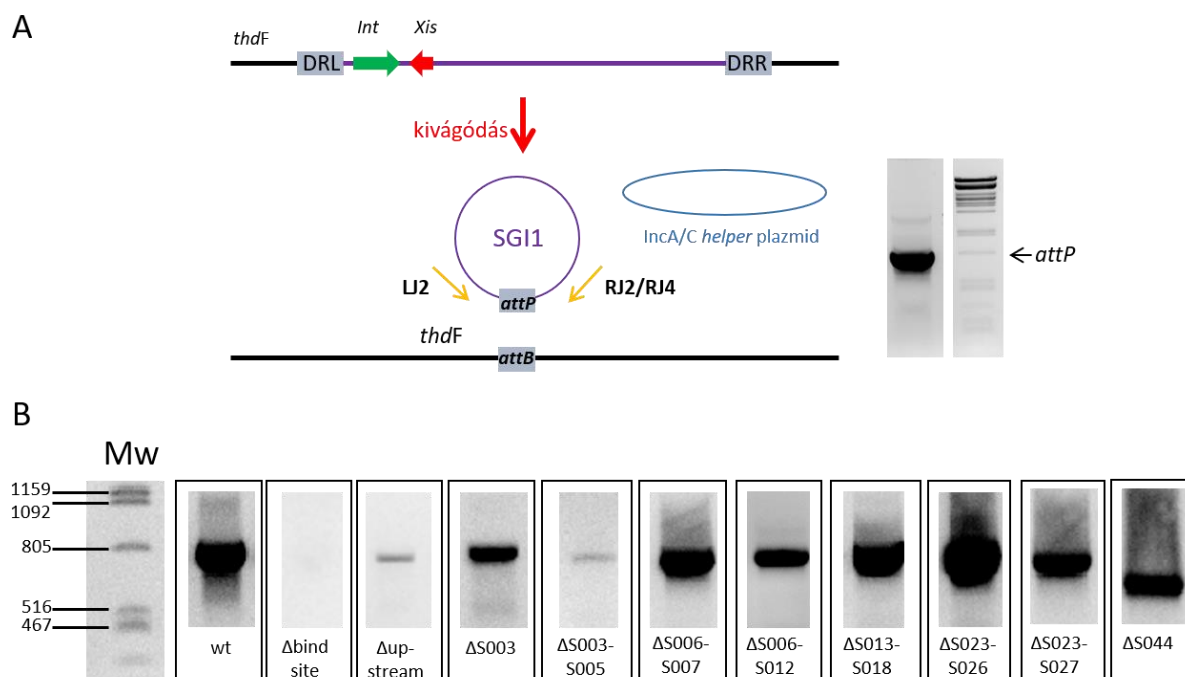
Az SGI1 mutánsok transzferét R55 *helper* plazmid jelenlétében konjugációs tesztekkel vizsgáltuk (ld. III/7.).

A *P<sub>xis</sub>* régióban deléciós mutáns SGI1-ek vizsgálata során azt az eredményt kaptuk, hogy a *P<sub>xis</sub>* AcaCD kötőhelyének deléciója ( $\Delta$ bind site) a genomi sziget kivágódásának és konjugatív transzferének megszűnését eredményezte, míg a *P<sub>xis</sub>* *upstream* régiójának deléciója ( $\Delta$ upstream) számottevően nem befolyásolta sem a kivágódást, sem a konjugatív transzfer (11. ábra).



**11. ábra Az SGI1 $\Delta$ bind site és az SGI1 $\Delta$ upstream kivágódásának és konjugatív transzferének vizsgálata.** Az SGI1 kivágódását és konjugatív transzferét R55 *helper* plazmid jelenlétében vizsgáltuk. A transzfer frekvenciákat az SGI1 transzkonjugáns és a TG2 recipiens titerek (CFU/ml) hányadosaként adtuk meg. \*Az SGI1 AcaCD kötőhely deléciós mutáns transzfer frekvenciája a detekciós limit alatt volt. 1: wt: TG1Nal::SGI1-C/R55, 2:  $\Delta$ bind site: TG1Nal::SGI1-C $\Delta$ bind site/R55, 3:  $\Delta$ upstream: TG1Nal::SGI1-C $\Delta$ upstream/R55. Mw: molekulasúly marker ( $\lambda$  *Pst*I).

Az SGI1 $\Delta$ bind site mutáns kivételével minden SGI1 mutáns képes volt kivágódni a kromoszómáról, mivel akár a *helper*, akár a pJKI828 jelenlétében tudtunk *attP* szekvenciát amplifikálni (12. ábra). Az SGI1 $\Delta$ upstream és az SGI1 $\Delta$ S003-S005 mutánsoknál azonban az amplifikált *attP* fragment lényegesen kevesebbnek mutatkozott többszöri ismétlésben is. Ennek okára azóta egy másik kutatásunk derített fényt, ami azonban nem része jelen munkának.



**12. ábra Az SGI1 kivágódásának detektálása *attP*-specifikus PCR-rel.**

A) Az SGI1 a *xis* expressziójának hatására kivágódik a bakteriális kromoszómáról. Az *attP* hely kialakulását *attP*-specifikus PCR-rel detektáltuk LJ2-RJ2 (827 bp) primerpárokkal, illetve az SGI1 $\Delta$ S044 mutánsnál LJ2-RJ4 (594 bp) primerpárokkal, mivel e mutánsban az RJ2 primer csatoló helyét eltávolítottuk. B) Az *E. coli* TG1Nal::SGI1 wt és SGI1 $\Delta$ mutáns törzseket (NalRSmRSpR) transzformáltuk pJKI828 plazmiddal (KmR), majd a felnőtt telepeket *attP*-specifikus PCR-rel teszteltük. Mw: molekulásúly marker ( $\lambda$  *Pst*I).

Az SGI1 $\Delta$ bind site mutáns kivételével mindegyik deléciós mutáns konjugáltatható volt *E. coli* TG90 recipiensbe (2. táblázat).

Az SGI1 $\Delta$ S003 transzfer frekvenciája két nagyságrenddel magasabb, míg az SGI1 $\Delta$ S003-S005 transzfere egy nagyságrenddel alacsonyabb volt a wt-hoz képest. Az SGI1 $\Delta$ S003 deléciós mutáns eredménye kiugrónak számít, amelyet az is okozhat, hogy a donortörzs több, mint  $5\times$  túlnőtte a recipiens törzset. Az SGI1 $\Delta$ S006-S007 és az SGI1 $\Delta$ S006-S012 mutánsok transzfer frekvenciája nagyságrendileg nem különbözött a wt-étől. Az SGI1 $\Delta$ S013-S018 mutáns transzfere két nagyságrenddel magasabb volt a wt-hoz képest. Ebben az esetben azonban a donor törzs titere alig volt magasabb a recipiens titerénél. Az SGI1 $\Delta$ S023-26, az SGI1 $\Delta$ S023-S027 és az SGI1 $\Delta$ S044 mutánsok transzfere két nagyságrenddel volt magasabb a wt-hoz képest, de megemlítendő, hogy ezekben a mérésekben a donor törzsek szintén többszörösen túlnőtték a recipiens törzset. Mindezek alapján azt mondhat-

jük, hogy a konjugációs kísérletekből kapott eredményeket fenntartásokkal kell kezelni, mert a transzfer frekvenciáját a donor:recipiens arány eltérése az egyes kísérletekben jelentősen befolyásolhatja, akár 1-2 nagyságrendi eltérést is okozhat.

Donor törzs*	Donor titer ( $\times 10^9/\text{ml}$ )	Recipiens titer (TG90) ( $\times 10^9/\text{ml}$ )	SGI1 transzkonjugáns titer ( $\times 10^7/\text{ml}$ )	SGI1 konj. frekvencia transzkonjugáns/recipiens
SGI1 wt	2,2	2,4	1,6	$7,04 \times 10^{-3} \pm 6,55 \times 10^{-3}$
SGI1ΔS003	5,6	0,85	25	$4,63 \times 10^{-1} \pm 3,81 \times 10^{-1}$
SGI1ΔS003-S005	3,4	2,1	0,13	$8,06 \times 10^{-4} \pm 7,83 \times 10^{-4}$
SGI1ΔS006-S007	3,6	1,4	1,8	$1,33 \times 10^{-2} \pm 3,59 \times 10^{-3}$
SGI1ΔS006-S012	1,4	1,4	0,76	$7,21 \times 10^{-3} \pm 5,87 \times 10^{-3}$
SGI1ΔS013-S018	2,9	2,1	37	$1,71 \times 10^{-1} \pm 1,51 \times 10^{-1}$
SGI1ΔS023-S026	4,4	1,8	57	$3,28 \times 10^{-1} \pm 6,38 \times 10^{-2}$
SGI1ΔS023-S027	2,6	1,6	15	$1,56 \times 10^{-1} \pm 1,74 \times 10^{-1}$
SGI1ΔS044	4,7	0,9	27	$6,12 \times 10^{-1} \pm 6,84 \times 10^{-1}$

## 2. táblázat SGI1 mutánsok konjugatív transzferének vizsgálata.

Az SGI1 konjugatív transzferét R55 *helper* plazmid jelenlétében vizsgáltuk. A transzfer frekvenciákat az SGI1 transzkonjugáns és a TG90 recipiens titerek (CFU/ml) hányadosaként adtuk meg. \*Donor törzsek: *E. coli* TG1Nal::SGI1-C wt vagy SGI1-C mutáns + R55 wt.

Az SGI1ΔS003 és az SGI1ΔS003-S005 mutánsok deléciói feltehetően a replikációs funkciókat érintik. Mivel ellentmondásos eredmények születtek, így további, az S003-S005 régiót érintő deléciós mutáns transzferét is megvizsgáltuk (3. táblázat).

Donor törzs/R55*	Donor titer ( $\times 10^9/\text{ml}$ )	Recipiens titer (TG90) ( $\times 10^9/\text{ml}$ )	SGI1 transzkonjugáns titer ( $\times 10^7/\text{ml}$ )	SGI1 konj. frekvencia transzkonjugáns/recipiens
SGI1wt	2,0	8,7	6,2	$9,47 \times 10^{-3} \pm 1,04 \times 10^{-2}$
SGI1ΔS004	1,0	11	0,35	$3,29 \times 10^{-4} \pm 1,91 \times 10^{-4}$
SGI1ΔS003-S004	0,87	12	1,1	$8,91 \times 10^{-4} \pm 2,17 \times 10^{-4}$
SGI1ΔS004-S005	1,3	8,7	0,2	$3,85 \times 10^{-4} \pm 4,55 \times 10^{-4}$

## 3. táblázat A replikációs funkciókat érintő deléciós mutánsok konjugatív transzferének vizsgálata.

Az SGI1 konjugatív transzferét R55 *helper* plazmid jelenlétében vizsgáltuk.

A transzfer frekvenciákat az SGI1 transzkonjugáns és a TG90 recipiens titerek (CFU/ml) hányadosaként adtuk meg. \*Donor törzsek: *E. coli* TG1Nal::SGI1-C wt vagy SGI1-C mutáns + R55 wt.

Az eredmények szerint az SGI1ΔS004, SGI1ΔS003-S004 és SGI1ΔS004-S005 transzfere egy nagyságrenddel alacsonyabb frekvenciát mutatott a wt-hoz képest. Ebben a mérésben a donor:recipiens arány a keresztezések végére azonos volt, így az eredmények hitelesebbnek tűnnek. A replikációs funkciókat érintő mutációk itt tapasztalt fenotípusának okait

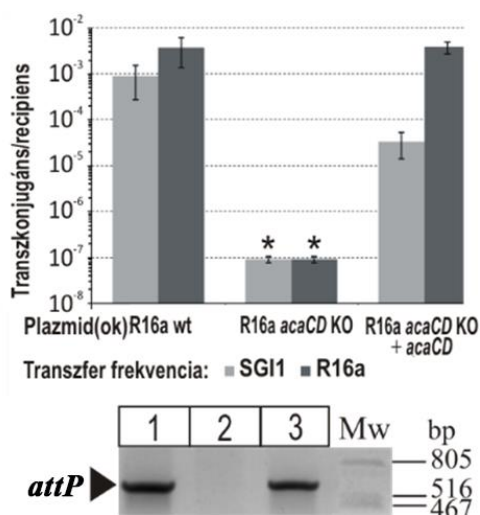
egy későbbi, még nem publikált munka keretében analizáltuk (Szabó és mtsai, előkészületben).

Az eredményekről elmondható, hogy az SGI1 mutánsok nagy többsége (az SGI1 $\Delta$ bind site mutáns kivételével) képes a kromozómáról való kivágódásra *helper* plazmid vagy AcaCD-termelő plazmid jelenlétében, illetve *helper* plazmiddal mobilizáltathatók. Összességében elmondható, hogy az SGI1 kivágódásának és konjugatív transzferének alapfeltétele a P<sub>xis</sub> AcaCD kötőhely megléte.

## 2. Az SGI1 AcaCD-függő mobilizációja

A P<sub>xis</sub> deléziós analízise alapján sejthető volt, hogy az AcaCD aktivátor funkciót tölt be az SGI1 kivágódásának szabályozásában. Ezért az SGI1 kivágódását és mobilizációját egy *acaCD* deléziós mutáns R16a IncC *helper* plazmid jelenlétében is megvizsgáltuk *attP*-specifikus PCR reakciókban és konjugációs teszttel. Korábbi kísérletekből kiderült, hogy az R55 és az R16a plazmid ugyanolyan hatékonyan mobilizálja az SGI1-et (Kiss és mtsai, 2015), így kísérleti modelljeinkben a *helper* plazmidok helyettesíthetők egymást attól függően, hogy mely antibiotikum rezisztencia markereket tudjuk használni az adott kísérleti elrendezésben.

Az R16a *acaCD* deléziójának hatására sem SGI1, sem R16a transzferét nem lehetett detektálni, illetve az SGI1 kivágódását sem tudtuk kimutatni a fentebb már bemutatott *attP*-specifikus PCR-ral (13. ábra).



**13. ábra Az R16a $\Delta$ acaCD mutáns konjugációjának és az SGI1 konjugációjára gyakorolt hatásának vizsgálata és komplementálhatóságának tesztelése.**

A  $\Delta$ acaCD mutáció R16a konjugatív transzferre gyakorolt negatív hatása *transz*-komplementálható AcaCD expresszióval. Az AcaCD expressziója a pJKI839 plazmidról történt. A gélképen a donor törzsek *attP*-specifikus PCR eredményei (a kivágódott, körre zárt SGI1-re jellemző amplikon) láthatók (1: TG1Nal::SGI1-C/R16a, 2: TG1Nal::SGI1-C/R16a $\Delta$ acaCD, 3: TG1Nal::SGI1-C/R16a $\Delta$ acaCD + pJKI839) Mw: molekulásúly marker ( $\lambda$  PstI).



Az R16a plazmid funkcióvesztésének *transz*-komplementálhatóságát szintén megvizsgáltuk. A komplementációs kísérletben az R16a $\Delta$ *acaCD* plazmid mellé AcaCD aktivátort expresszáló plazmidot (pJKI839) transzformáltunk és az előzőekhez hasonlóan SGI1 kivágódását, valamint a sziget és a *helper* plazmid transzferét is vizsgáltuk. A pJKI839 az előző kísérletben használt KmR pJKI828 plazmid GmR származéka, melyet az R16a *helper* plazmid KmR és ApR markerei miatt használtunk.

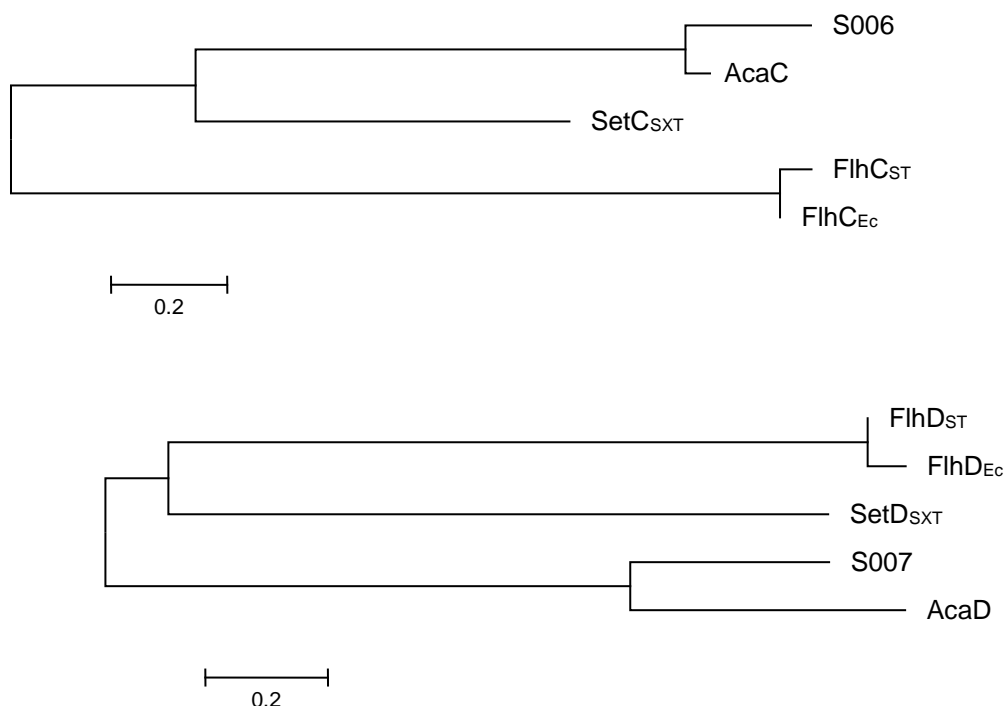
Az AcaCD termelő plazmid jelenlétében az SGI1 és az R16a $\Delta$ *acaCD* plazmid konjugációja többé-kevésbé helyreállt, illetve az SGI1 kivágódása PCR-rel is megerősíthető volt. Az R16a transzfer frekvenciája megközelítette a wt R16a transzfer frekvenciáját, köztük nem tudtunk szignifikáns különbséget kimutatni. Ezzel szemben az SGI1 transzfer frekvenciája kb. egy nagyságrenddel alacsonyabb volt ahhoz képest, amikor wt R16a plazmiddal mobilizáltuk.

Eredményeink alapján azt mondhatjuk, hogy a *helper* kódolta AcaCD aktivátor nem csupán az SGI1 mobilizációjához, hanem az R16a plazmid konjugatív transzferéhez is nélkülözhetetlen. Bizonyítottuk, hogy az *acaCD* delécio *transz*-komplementálható.

### **3. Az AcaCD homológ SGI1 mesterregulátor azonosítása**

Az SGI1 S007-S006 ORF-ok elhelyezkedésük és közelségük alapján egy operont alkotnak. A két ORF által kódolt fehérjék szekvenciáit összehasonlítva fehérje adatbázisok szekvenciáival kiderült, hogy homológok az FlhDC családba tartozó fehérjék megfelelő alegységeivel. A SetDC (SXT), illetve az FlhDC (*E. coli* és *Salmonella*) fehérjékkel távolabbi rokonságot mutatnak, mint a *helper* kódolta AcaC és AcaD fehérjékkel (14. ábra) (Kiss és mtsai, 2015).

A szekvencia hasonlóság miatt felmerült tehát, hogy az SGI1 is expresszálhat egy aktív regulátort. Emellett szól, hogy az S007 konstitutív promóterrel rendelkezik, amelynek aktivitása megközelítőleg a  $P_{int}$  aktivitásának harmada (Kiss és mtsai, 2015), valamint a két ORF aktív transzkripciója is kimutatható volt (Golding és mtsai, 2007). Funkcióképes regulátor termelődésének hipotézise ellen szól, hogy az SGI1 $\Delta$ S006-S007 mutáns kivágódása látszólag nem sérült, valamint a delécio nem okozott szignifikáns eltérést az SGI1 konjugációs frekvenciájában. Az SGI1 spontán vesztődése sem volt megfigyelhető a *helper* hiányában és a kivágódott sziget *nested*-PCR-rel is csak nehezen detektálható (Boyd és mtsai, 2000, 2001; Djordjevic és mtsai, 2009; Kiss és mtsai, 2012). Mindezek alapján úgy tűnt, hogy az S007-S006 ORF-ok által kódolt fehérjék inaktívak, holott transzkripciójuk lezajlik és szekvenciájuk alapján valószínűleg ép polipeptideket kódolnak.



**14. ábra** Az S006 és S007 fehérjék szekvenciájának összehasonlítása az AcaCD, SetCD<sub>SXT</sub>, *E. coli* FlhDC<sub>Ec</sub> és *Salmonella* FlhDC<sub>ST</sub> fehérjékkel.

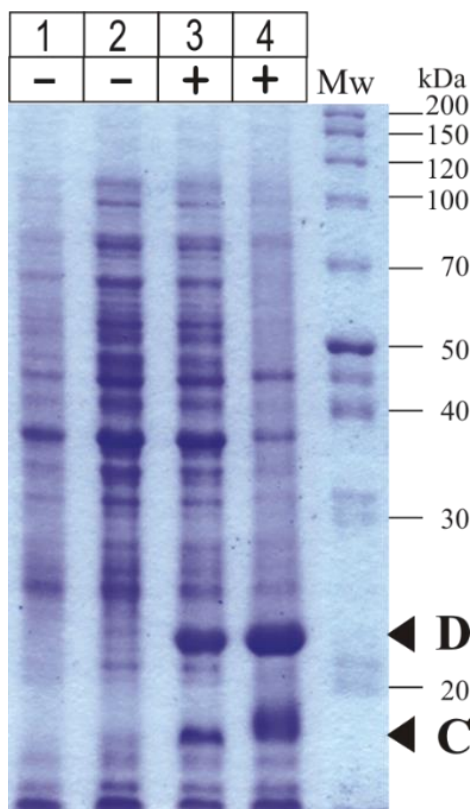
A fehérjék filogenetikai rekonstrukciója „maximum likelihood” módszerrel készült (Kiss és mtsai, 2015).

A fehérjék funkcióképességének vizsgálatához az S007 és S006 géneket, valamint az R55 plazmid *acaCD* génjeit is pET16b alapú expressziós vektorba klónoztuk a P<sub>T7</sub> promóter szabályozása alá helyezve a két operont (pGMY3: P<sub>T7</sub>::S007-S006 és pJKI878: P<sub>T7</sub>::*acaCD*). A pET16b alapú expressziós plazmidok alkalmasak nagy mennyiségű fehérje termeltetésre T7 polimerázt termelő törzsekben (pl. *E. coli* Tuner (DE3)), ahol a P<sub>T7</sub> aktivitása szükség szerint IPTG-vel növelhető. A fehérjék termelődését SDS PAGE-sel vizsgáltuk.

A fehérjék expresszióját induktív és non-induktív körülmények mellett vizsgáltuk (0 vagy 0,5 mM IPTG 2 órán keresztül 37°C-on). A vizsgálatban negatív kontrollként a pET16b üres vektort (indukáló hatás nélkül) használtuk. A pGMY3 IPTG-indukció nélkül nem termelt detektálható fehérje mennyiséget, azonban 0,5 mM IPTG hozzáadásával megjelentek az S006 és az S007 fehérjék, amelyek megfeleltethetők az AcaCD hasonló méretű fehérjealegységeinek. Az S006 az AcaC fehérjével, az S007 az AcaD fehérjével mutat méretbeli hasonlóságot (15. ábra).

Ezután az aktivátorokat termelő plazmidok és az SGI1 együttes fennmaradását teszteltük *E. coli* Tuner::SGI1-C törzsben. Mivel az SGI1 kivágódása a sziget vesztődésével jár, így a kétféle regulátor aktivitása jellemezhető az alapján, hogy milyen mértékben vesztődik az SGI1 az expressziós plazmidok mellől. Már a transzformánsok száma is utalhat a vesztődés

mértékére, amennyiben az SGI1-re és a bejuttatni kívánt expressziós plazmid rezisztencia markereire is szelektálunk. Ennek megfelelően a transzformánsokat LA+Sm+Sp+Ap lemezen számoltuk. A pet16b kontrollhoz ( $7,6 \times 10^5$  CFU/mg DNS) képest az S007-S006-ot termelő plazmiddal harmadannyi ( $2,4 \times 10^5$  CFU/mg DNS), az AcaCD-t termelő plazmiddal megközelítőleg huszadannyi ( $3,1 \times 10^4$  CFU/mg DNS) transzformánst kaptunk.



**15. ábra A FlhDC<sub>SGI1</sub> és AcaCD expressziójának vizsgálata SDS-PAGE-sel.**

1: negatív kontroll (pET16b); 2-3: S007-S006 expressziója  $P_{T7}$  szabályozása alatt (pGMY3), 4: AcaCD expressziója  $P_{T7}$  szabályozása alatt (pJKI878). '-' és '+': nem indukáló és indukáló hatás (0 vagy 0,5 mM IPTG 2 órán keresztül 37°C-on). D és C: FlhD és FlhC, illetve AcaD és AcaC alegységek. Mw: molekulásúly marker.

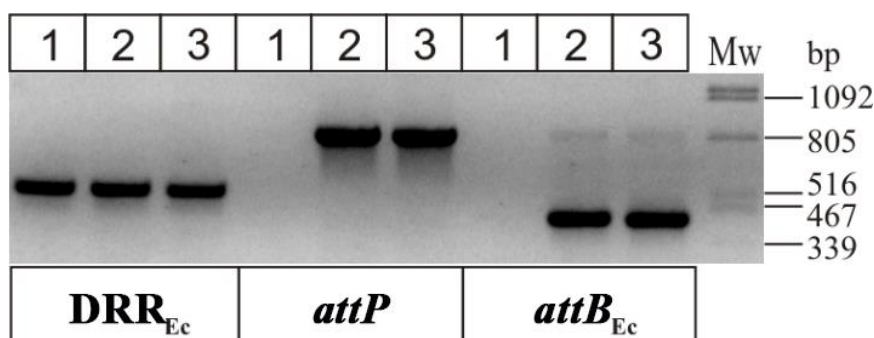
Ahhoz, hogy megvizsgáljuk, hogy hasonló aktivátor funkcióval rendelkeznek-e ezek a fehérjék, mint a korábban vizsgált AcaCD, az SGI1 kivágódását is vizsgáltuk a pGMY3 és pJKI878 expressziós plazmidok jelenlétében *E. coli* Tuner::SGI1-C törzsben. Mivel az *attP*-specifikus PCR vizsgálat alapján a pJKI878 elégséges mennyiségű aktivátort termelt annak ellenére, hogy az operon első génje az Acr1 represszort termeli, így az alábbi kísérletekben külön nem indukáltuk a fehérje expressziót. A pJKI878 indukálásával olyan sok AcaCD aktivátor expresszálódik, hogy az SGI1 nem fenntartható a kísérlet elvégzéséhez szükséges ideig. Az expressziós plazmidokat már tartalmazó törzseket LB+Sm+Sp+Ap tápoldatban növesztettük, amellyel mind az SGI1-re, mind a pET16b alapú plazmidokra szelektáltunk. Az SGI1 kivágódását *attP*- és *attB*<sub>Ec</sub>-specifikus, míg az SGI1 integrálódott formáját DRR<sub>Ec</sub>-

specifikus PCR-rel vizsgáltuk. A pGMY3 és pJKI878 plazmidok jelenlétében is detektálható volt a kivágódás, míg a pET16b jelenlétében kivágódást nem észleltünk (16. ábra).

Eredményünk alapján az AcaCD, illetve az S007-S006 aktivátorok egyaránt indukálják az SGI1 kivágódását, tehát funkcióik legalább részben, hasonlóak.

Mivel a kivágódott SGI1 instabil, azaz vesztődik a baktériumpopulációból (Kiss és mtsai, 2012), ezért replika technikával megvizsgáltuk az SGI1 stabilitását a két expressziós plazmid jelenlétében *E. coli* Tuner::SGI1-C törzsekben. Ebben a vizsgálatban csak az expressziós plazmidokra szelektáltunk a transzformálást követően (LA+Ap). Az LA+Ap táptalajon felnőtt telepeket replikáztuk plazmidra szelektív (LA+Ap), illetve az SGI1-re és plazmidra együttesen szelektív (LA+Sm+Sp+Ap) táptalajra. Az SGI1 vesztődését a két féle szelekció mellett kinőtt telepszámok közötti különbség és az LA+Ap táptalajon nőtt telepek számának hányadosaként számoltuk. A két plazmid esetén különböző mértékű volt az SGI1 vesztődése. Az AcaCD expressziója mellett az SGI1 97-100%-ban, míg az S007-S006 expressziója mellett az SGI1 0,4-4,4%-ban veszett el a baktériumpopulációból. A pET16b negatív kontroll esetében detektálható mértékű vesztődés nem volt (<0.14%).

Az adatok alapján azt mondhatjuk, hogy az SGI1-en kódolt aktivátor működésében is hasonló az AcaCD-hez, bár hatása nem olyan erőteljes. Az eddigi eredmények megerősítik, hogy az S007-S006 az AcaCD-hez hasonló funkciókat láthat el, illetve szekvencia hasonlóságok alapján az S007-S006 fehérjék az AcaCD-hez hasonlóan az FlhDC családba tartoznak, ezért ezeket, együttesen FlhDC<sub>SGI1</sub>-nek neveztük el.



**16. ábra** Az S007-S006 indukálja SGI1 kivágódását.

Az oszlopok számai az *E. coli* Tuner::SGI1-C törzsbe transzformált különböző tesztelő plazmidokat jelölik: 1: pET16b (P<sub>T7</sub>, negatív kontroll), 2: pGMY3 (P<sub>T7</sub>::S007-S006), 3: pJKI878 (P<sub>T7</sub>::acaCD, pozitív kontroll). Mw: molekulásúly marker ( $\lambda$  PstI).

#### 4. Az FlhDC<sub>SGII</sub> komplementálja a R16a *acaCD* delécióját

Az SGI1 és az IncC plazmidok által kódolt regulátor közötti szekvencia és funkcionális hasonlóságok miatt azt feltételeztük, hogy az FlhDC<sub>SGII</sub> azokon a promótereken is aktivátorként működhet, melyeket korábban AcaCD-függő promóterekként azonosítottak vagy az AcaCD kötőhely megléte miatt feltételezték róla, hogy a tőle *downstream* elhelyezkedő gén, gének az AcaCD szabályozás alatt állnak (Carraro és mtsai, 2014a). Mivel ezen gének jelentős része nélkülözhetetlen az IncC plazmidok konjugatív transzferében, így leggyorsabban a konjugációra nézve defektív *acaCD* deléciós mutáns komplementálhatóságával volt vizsgálható a jelenség.

A komplementációhoz FlhDC<sub>SGII</sub>, valamint pozitív kontrollként AcaCD fehérjét expresszáló plazmidokat használtunk. Az expressziós plazmidokon (pJKI1040, pJKI1038) a regulátor fehérjék (FlhDC<sub>SGII</sub>, AcaCD) *P<sub>tac</sub>* szabályozása alatt állnak. Így az *in vivo* termeltetett fehérje mennyisége jelentősen több a natív állapothoz képest, valamint szükség szerint az aktivátorok mennyisége IPTG-vel indukálható is. A kísérletekhez negatív kontrollként a pJKI1036, fehérjét nem expresszáló vektort használtuk.

A komplementációhoz konjugációs kísérleteket végeztünk (ld. III/7.). Az expressziós plazmidokat az előző kísérletekben szerzett tapasztalatok alapján jelen kísérleti rendszerben sem indukáltuk. A negatív kontrollként szolgáló pJKI1036 mellől sem az SGI1, sem az R16aΔ*acaCD* plazmid nem volt képes átjutni a recipiens baktériumokba, transzkonjugáns telepeket nem kaptunk. A pJKI1038 és pJKI1040 mellől mind az SGI1, mind az R16a transzfere kimutatható volt. A pJKI1040 jelenlétében mind az SGI1 és mind az R16aΔ*acaCD* transzfer frekvenciája megközelítőleg 3-5× nagyobb értéket mutatott, mint amikor az AcaCD fehérjét expresszáltattuk (4. táblázat).

Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy az FlhDC<sub>SGII</sub> is képes aktiválni az R16a transzfer génjeit, tehát képes ellátni az AcaCD szabályozó funkciót. Mindez alátámasztja azt az elképzelést, hogy mindkét regulátor ugyanazon kötőhelyeken hatnak.

Donor TG1Nal::SGI1-C/ R16aΔ <i>acaCD</i> +	Transzkonjugáns/recipiens		Transzkonjugáns/donor	
	R16aΔ <i>acaCD</i>	SGI1-C	R16aΔ <i>acaCD</i>	SGI1-C
pJKI1036 (-)	$<2,6 \pm 0,7 \times 10^{-8}$	$<2,6 \pm 0,7 \times 10^{-8}$	$<2,1 \pm 1,0 \times 10^{-8}$	$<2,1 \pm 1,0 \times 10^{-8}$
pJKI1038 (AcaCD)	$7,3 \pm 5,6 \times 10^{-4}$	$3,6 \pm 1,4 \times 10^{-3}$	$1,2 \pm 0,5 \times 10^{-3}$	$6,7 \pm 1,9 \times 10^{-2}$
pJKI1040 (FlhDC <sub>SGII</sub> )	$5,5 \pm 1,5 \times 10^{-3}$	$1,0 \pm 0,3 \times 10^{-2}$	$5,3 \pm 1,7 \times 10^{-3}$	$9,9 \pm 3,0 \times 10^{-2}$

4. táblázat A R16aΔ*acaCD* mutáns konjugációs deficienciájának *transz*-komplementációja.

## 5. Az SGI1 *acaCD*-reszponzív promótereinek vizsgálata

Az előző kísérletek alapján feltételeztük, hogy az FlhDC<sub>SGI1</sub> és az AcaCD fehérjék azonos kötőhelyeket ismernek fel.

$\beta$ -galaktozidáz tesztel vizsgáltuk meg az FlhDC<sub>SGI1</sub> és AcaCD aktivitását, amelyhez olyan mérőplazmidokat használtunk, amelyek a *xis upstream* régiójának különböző szakaszait hordozták. A mérőplazmidokban a *lacZ* promóter régióját lecseréltük a *xis* előtti *upstream* szekvenciákra oly módon, hogy a *lacZ* start kodonját a *xis* START kodonjával helyettesítettük. A *xis* expresszióját így a *lacZ* expressziója reprezentálja, ezért a *xis* promóterén indukált transzkripciót  $\beta$ -galaktozidáz aktivitással lehet mérni.

A pJKI1003 a *xis* teljes *upstream* régióját hordozza az S003 STOP kodonjáig bezárólag (2306-1947 bp). A pJKI1013 és pJKI1014 plazmidok tartalmazzák a prediktált AcaCD kötőhelyet egy rövidebb és egy hosszabb határoló szekvenciával együtt (2052-1947 bp, illetve 2043-1947 bp), míg a pJKI1016-ban hiányzik az AcaCD kötőhely és ebben a szekvenciában a promóter régióból kizárólag a -10 boxokat lehet felismerni (2012-1947 bp). A  $P_{xis}$  aktivitását az AcaCD (pJKI888:  $P_{tac}::acaCD$ ) és az FlhDC<sub>SGI1</sub> (pGMY6:  $P_{tac}::flhDC_{SGI1}$ ) jelenlétében, illetve hiányában (pJKI88, üres vektor) mértük. Mindkét aktivátor indukálta a *lacZ* expressziót minden olyan mérőplazmid esetében, ahol az AcaCD kötőhely intakt maradt (17. A ábra).

Kísérleteink eredménye alapján megállapítható, hogy az FlhDC<sub>SGI1</sub> és az AcaCD aktivátorok kizárólag a prediktált AcaCD kötőhely jelenlétében indukálják a *xis* expresszióját. Mivel *footprint* kísérletekkel igazoltuk az AcaCD fehérjék kapcsolódását a prediktált kötőhelyhez (Kiss és mtsai 2015), így joggal feltételezhetjük, hogy az SGI1 által kódolt FlhDC<sub>SGI1</sub> ugyanazon kötőhelyhez kapcsolódva aktiválja a  $P_{xis}$ -t. Az FlhDC<sub>SGI1</sub> azonban kevésbé hatékony aktivátornak tűnik, mivel ebben az esetben a  $\beta$ -galaktozidáz aktivitás mindössze 13-36%-a volt az AcaCD jelenlétében mért aktivitásának. A konszenzus szekvenciát felhasználva az SGI1-en további négy AcaCD kötőhelyet lehetett prediktálni az S004, S005 (*traN*), S012 és S018 (*traH*) gének *upstream* régióiban (Carraro és mtsai, 2014a). Az előző kísérlet eredménye alapján feltételeztük, hogy az AcaCD és az FlhDC<sub>SGI1</sub>, a többi prediktált AcaCD kötőhellyel rendelkező promótert is képes aktiválni.

A promóterek AcaCD- és FlhDC<sub>SGI1</sub> indukálhatóságát az előzőekhez hasonlóan  $\beta$ -galaktozidáz aktivitás mérésekkel vizsgáltuk. Ehhez az S005, S012, S018 ORF-ok *upstream* szekvenciáit az előzőekben használt *lacZ* mérőplazmidba klónoztuk (pMSZ953, pMSZ954 és pMSZ955).

Aktivátorok hiányában P<sub>S005</sub> és P<sub>S012</sub> esetén  $\beta$ -galaktozidáz aktivitást nem tudtunk mérni (hasonlóan P<sub>xis</sub>-hez), míg P<sub>S004</sub> és P<sub>S018</sub> esetében gyenge alap aktivitást ( $4,7 \pm 2,4$ , illetve  $15,1 \pm 12,1$  unit) tapasztaltunk. Méréseink visszaigazolták sejtéseinket, azaz az összes vizsgált promótert indukálta akár az FlhDC<sub>SGII</sub>, akár az AcaCD epressziója. A FlhDC<sub>SGII</sub> ismét kevésbé hatékonynak bizonyult, hiszen az AcaCD által indukált expresszió hozzávetőlegesen háromszor erősebb volt mindegyik promóteren (17. B ábra). Az P<sub>S004</sub> mért indukciók megerősíteni vélték azt a hipotézisünket is, hogy az S004 gént hibásan annotálták és az S004 által kódolt fehérje valójában 21 aminosavval rövidebb lehet.

**A**

β-galaktosidáz (unit)

Testtelő plazmid: pJKI1003 pJKI1013 pJKI1014 pJKI1016

P<sub>Xis</sub> régiók:

2306 2052 2044 2012 1947

S003...aggcggtataacttcttgcgcctaaaggcagatccagagcgaggattgtagctgcataaactagggttAtcaataactgggtgtgaacgggtagctgaag...xis

AcaCD kötőhely

-10 +1

SD Met

pJKI1003

pJKI1013

pJKI1014

pJKI1016

**B**

β-galaktosidáz (unit)

Testtelő plazmid: pJKI1003 pMSZ965 pMSZ953 pMSZ954 pMSZ955

Promóter régió: P<sub>Xis</sub> P<sub>S004</sub> P<sub>S005</sub> P<sub>S012</sub> P<sub>S018</sub>

Negativ kontroll FliHDC<sub>SG11</sub> AcaCD

A) Az FlhDC<sub>SGII</sub> kötőhelyének meghatározása a P<sub>xis</sub> térképezésére használt mérőplazmidok segítségével. A grafikon a *xis* egyre rövidebb *upstream* régióin mért promóter aktivitást mutatja, amelyet  $\beta$ -galaktozidáz mérésel határoztunk meg FlhDC<sub>SGII</sub> és AcaCD jelenlétében. A grafikon alatt látható, hogy a mérőplazmidok pontosan mely szakaszt hordozták a promóter régióknak, a szekvenciában az AcaCD kötőhelyet, a -10 boxot, a TSS- és Shine-Dalgarno szekvenciát jelöltük. B) Az SGI1 prediktált AcaCD-reszponzív promótereinek aktivitása  $\beta$ -galaktozidáz mérésben FlhDC<sub>SGII</sub> és AcaCD jelenlétében. A mérésekben az aktivátorok expressziójához a p15a-alapú plazmidokat (pGMY6: FlhDC<sub>SGII</sub> és pJKI888: AcaCD) 0,05 mM IPTG-vel indukáltuk, míg negatív kontrollként üres vektort (pJKI88) használtunk.

## 6. Transzkripció starthelyek meghatározása

Az AcaCD-függő promóterek pontosabb jellemzése érdekében elhatároztuk, hogy meghatározzuk az általuk szabályozott gének transzkripció start pontjait (TSS) is. Ennek elsősorban az S004 gén esetén éreztük jelentőségét, mivel ezzel igazolható, hogy S004 ORF hibásan lett annotálva. A *xis* gén esetén már korábban meghatároztuk a TSS-t primer extenziós kísérlettel (Kiss és mtsai, 2015), így ezt a módszert választottuk az S004, S005, S012 és S018 ORF-ok TSS-ének meghatározásához is.

Az előző kísérletben használt mérőplazmidokat (pMSZ953, pMSZ954, pMSZ955 és pMSZ965) valamint az AcaCD-t expresszáló, illetve nem expresszáló plazmidot (pJKI888, illetve pJKI88) tartalmazó *E. coli* TG90 törzsekből totál RNS-t izoláltunk. Az extenziós reakciót (ld. III/11.) a *lacZ* 5' végéhez közel, 40 bp-re hibridizáló pUCfor21 primer felhasználásával végeztük. Az extenzió végtermékét, amely egy egyszálú DNS, 6% denaturáló poliakrilamid gélen vizsgáltuk az adott extenziós reakcióhoz tartozó plazmid szekvenáló reakciója mellett.

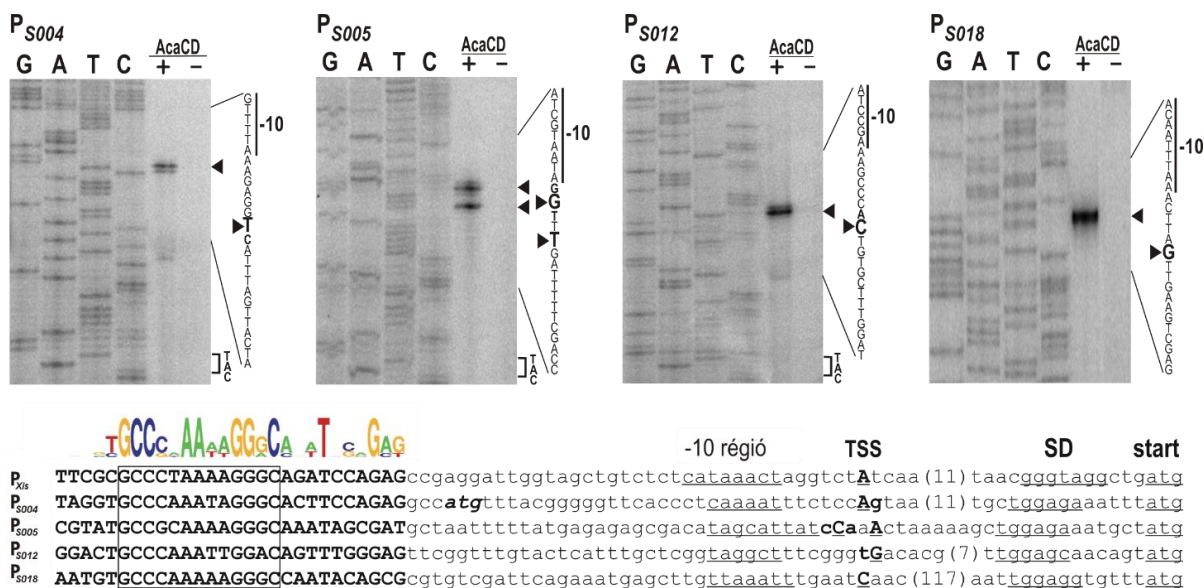
Az extenziós reakció végterméke mind a négy promóter vizsgálata esetén megfigyelhető volt AcaCD expresszáló plazmid jelenlétében (18. ábra), így a TSS-eket bázispárra pontosan meghatároztuk. Általánosan elmondható, hogy a promóterek -10 boxai (TATAAT) 4-6, az AcaCD kötőhelyek 25-30 bp-nyira helyezkednek el a TSS-ektől.

A TSS térképezés igazolta, hogy az S004 gént hibásan annotálták, mivel az S004 transzkriptum végpontja a korábban annotált S004L kódoló szekvencián belül, az általunk prediktált „belső” ATG kodontól 30 bp-ra található. Ez a TSS optimális távolságra helyezkedik el az S004 előtt talált AcaCD kötőhelytől. Az S005 esetén két TSS-t találtunk, 22, illetve 25 bp-nyira az S005 START kodonjától, míg az S012 transzkriptumok döntő többsége 26 bp-nyira található a START kodontól. Az S018 ORF promótere kissé eltér a többitől, mivel a TSS a START kodontól 135 bp-nyira található, viszont a -10 box és az AcaCD kötőhely a TSS-től hasonló távolságra helyezkedik, mint a többi promóternél, így a leghosszabb 5' nem transzlálódó régió az S018 transzkriptumában figyelhető meg. Bár viszonylag magasszintű alapaktivitást mértünk  $\beta$ -galaktozidáz teszttel, a konstitutívan expresszálódó transzkriptum TSS-ét nem tudtuk kimutatni. Az eredmény alapján feltételezhető egy gyenge konstitutív promóter jelenléte az S018 *upstream* régiójában, az AcaCD kötőhelyet megelőző régióban, amit ebben a kísérletben nem detektálhattunk.

Az S004, S005 és S012 ORF-ok esetében az extenziós reakció gyengébb jeleket is adott. Az S004 esetében az ATG kodontól 29, az S005 esetében 24 és 26, illetve az S012 ese-



tében 27 bp-nyira detektáltunk gyengébb extenziós reakciót, ami arra utal, hogy a transzkriptumoknak alternatív START helye is van a szomszédos pozíciókban.



#### 18. ábra Az SGI AcaCD/FlhDC<sub>SGII</sub>-reszponzív promóterei TSS-einek meghatározása.

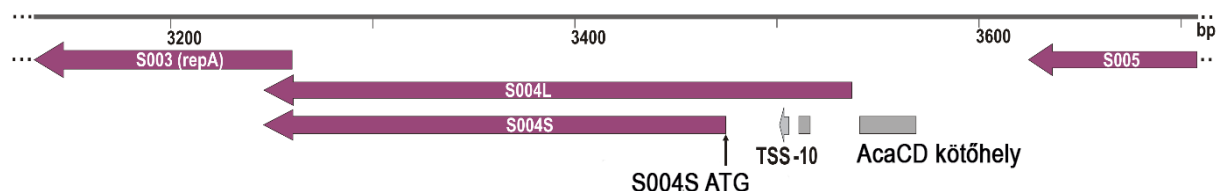
A primer extenziós reakciókhoz a pUCfor21 primert használtuk, amelyet a tesztelő plazmidokat és AcaCD-t expresszáló/nem expresszáló plazmidot (pJKI888/pJKI88) tartalmazó *E. coli* TG1-ből izolált RNS mintákon alkalmaztunk. A tesztelő plazmidok: pMSZ965 (P<sub>S004</sub>), pMSZ953 (P<sub>S005</sub>), pMSZ954 (P<sub>S012</sub>), pMSZ955 (P<sub>S018</sub>). G, A, T, C: a Sanger szekvenálás során a pUCfor21 primert és a megfelelő mérőplazmidot használtuk templát DNS-ként. A kis fekete nyilak a nem átíródnó szál azon bázisára mutatnak, ami megfelel az átíródnó szál TSS-ének. Az öt AcaCD-reszponzív promóter szekvenciáinak illesztésén jelöltük a feltételezett -10 boxokat (-10 régió), a Shine-Dalgarno szekvenciákat (SD-box) és a START kodonokat. A TSS-ek vastag nagybetűvel, aláhúzva szerepelnek az illesztésen. A prediktált AcaCD kötőhelyeket félkövér nagybetűkkel jelöltük, a konzervált motívumot keret jelöli. Az annotált S004 START kodonját félkövér dőlt kisbetűk jelölik.

### 7. Az S004 negatív hatása a baktérium növekedésére

A TSS térképezés bizonyította, hogy az S004 transzkripciója az annotált S004 gén belsőjéből indul (19. ábra), aminek következtében csak egy rövidebb fehérje transzlálódhat róla. Kíváncsiak voltunk, hogy a korábban annotált S004L és az általunk meghatározott S004S fehérjék között van-e valamilyen aktivitásbeli különbség, ezért az S004L és a feltehetőleg valós S004S ORF-okat a P<sub>tac</sub> mögé klónoztuk. Az így kapott pJKI1049 és pJKI1050 konstrukciókat *E. coli* TG1Nal törzsbe juttattuk és azt vizsgáltuk, hogy a kétféle fehérje expressziója milyen hatással van a baktériumok növekedésére.

A vizsgálathoz pozitív kontrollként az SGI RepA fehérjét expresszáló plazmidot használtuk (pJKI1048), amelyben az S003 ORF volt P<sub>tac</sub> szabályozása alá helyezve. A 35,3 kDa molekulatömegű RepA termeltetésével kapcsolatban azt feltételeztük, hogy mére-

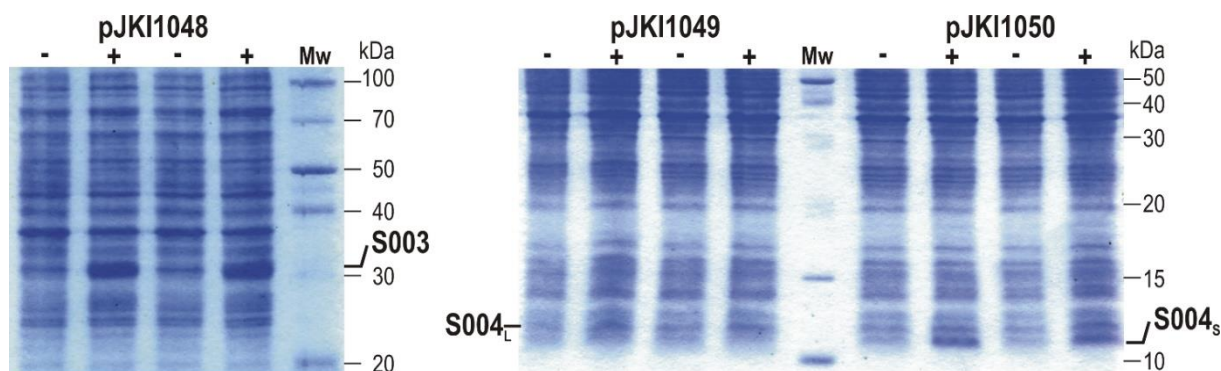
te miatt visszavetheti a baktérium növekedését, de biológiai aktivitással nem valószínű, hogy rendelkezik, hiszen a replikációs origó hiányzott rendszerünkben. Negatív kontrollként az üres expressziós vektort (pGMY8) használtuk.



**19. ábra Az S004L és S004S sematikus térképe.**

Az S004S az annotált S004L START kodonjához képest *downstream*, a kódoló szekvenciában található ATG-ről íródik át.

A fehérjék expresszióját *E. coli* Tuner (DE3) baktérium törzsben SDS PAGE-vel ellenőriztük (ld. III/8.). Mindhárom fehérje megtermelődött, bár az azonos promóter és SD-szekvencia ellenére S004L valamelyest alacsonyabb szinten expresszáldott, mint az S004S vagy a RepA fehérjék (20. ábra).



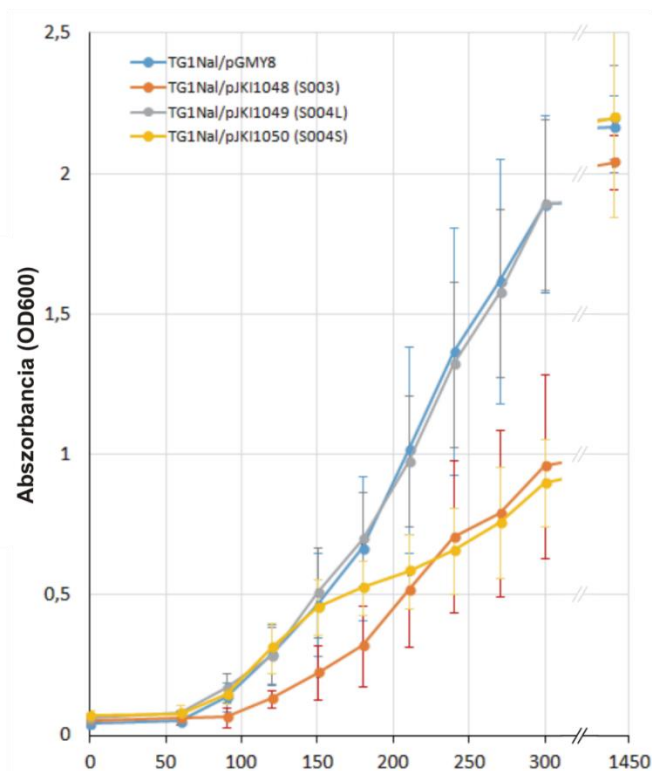
**20. ábra Az S003, S004L és S004S expressziójának vizsgálata SDS-PAGE-el *E. coli* Tuner (DE3) törzsben.**

pJKI1048:  $P_{tac}::S003$ , pJKI1049:  $P_{tac}::S004L$ , pJKI1050:  $P_{tac}::S004S$ , +/- indukált/nem indukált (0,5 vagy 0 mM IPTG), Mw: molekulásúly marker.

Ezt követően növekedési görbék felvételével vizsgáltuk a különböző fehérjéknek a baktériumok osztódására gyakorolt hatását. A vizsgálat során 24 órás inkubációt követően minden törzs elérte az  $OD_{600} \sim 2-2,2$  értéket, növekedésük azonban szignifikáns különbséget mutatott az első 5 órában (21. ábra). Az S004L-t expresszáldó törzs növekedése hasonló volt a negatív kontrolléhoz, viszont az S004S az S003-hoz hasonlóan negatívan befolyásolta a baktériumpopuláció növekedését.

Eredményünk arra utal, hogy az S004S fehérje, az eredetileg annotált hosszabb fehérjével szemben, rendelkezik valamilyen biológiai aktivitással, ami megerősíti azt a feltevésün-

ket, hogy az S004 ORF START kodonja valójában az eredetileg annotált S004L szekvencián belül található.



**21. ábra S003, S004L és S004S fehérjét expresszáló baktériumok növekedési görbéje.**

Az expressziós plazmidokat *E. coli* TG1Nal törzsbe vittük be: pGMY8: negatív kontroll ( $P_{tac}$  üres vektor), pJKI1048:  $P_{tac}::S003$ , pJKI1049:  $P_{tac}::S004L$ , pJKI1050:  $P_{tac}::S004S$ . A baktériumok növekedését 6-6 parallel kultúra OD<sub>600</sub> értékeinek átlagával ábráztuk.

## 8. Az SGI1 és IncA/C plazmidok között fennálló inkompatibilitás vizsgálata

Korábbi megfigyelések azt igazolták, hogy az SGI1 és az IncC plazmidok önmagukban meglehetősen stabilak (Kiss és mtsai, 2012; Hancock és mtsai, 2016), azonban együttes fenntartásuk során mindkét partner szegregációja, vesztődése detektálható (Kiss és mtsai, 2015; Harmer és mtsai, 2016).

Az SGI1 stabilitását elsősorban a kromoszómára való integrációja biztosítja (Kiss és mtsai, 2012). Korábbi kísérleteinkkel bizonyítottuk, hogy az SGI1 vesztődése elsősorban az AcaCD által indukált *xis* expressziónak a következménye, hiszen a *xis* kódolta excizionáz katalizálja a sziget kivágódását a kromoszómáról. Az SGI1 azonban egy funkcionális TA rendszert (*sgiAT*) is kódol, amely feltehetően az SGI1 kivágódott formájának stabilabb fennmaradását szolgálja (Huguet és mtsai, 2016).

Az IncA/C plazmidok stabilitását autonóm replikációjuk és Par rendszereik biztosítják (Llanes és mtsai, 1994; Carraro és mtsai, 2015b; Hancock és mtsai, 2016). Emellett hordoznak egy feltételezett TA rendszert is, amelyet eddig még nem tanulmányoztak részletesebben (Hancock és mtsai, 2016).

Mindezen stabilizáló funkciók ellenére SGI1 jelenlétében az IncA/C plazmidok gyakori elvesztődése tapasztalható (Harmer és mtsai, 2016), melyet saját megfigyeléseink is alátámasztanak. Az SGI1-K variáns mellett, melyből az SGI1 konzervált gerincében történt nagyméretű deléciónak miatt több funkcionális gén is elveszett (a deléciónak az S005 belsejétől az S009-ig tart), így az *flhDC*<sub>SGI1</sub> is, a *helper* plazmid stabilizálódni látszik (Harmer és mtsai, 2016).

Emellett megemlítené, hogy az SGI1 mobilizációja során a *helper* plazmid gyakran kisebb gyakorisággal jut át a recipiens sejtbe, mint az általa mobilizált SGI1 és az együttes transzfer is nagyon ritka, jóval alacsonyabb a két elemre külön mért transzfer gyakoriságából számítható értéknél (Douard és mtsai, 2010; Kiss és mtsai, 2012; Carraro és mtsai, 2014a). Mindez feltehetően abból fakad, hogy az SGI1 a maga számára előnyösen módosítja a konjugációs apparátust saját TraN, TraG és TraH fehérjéinek használatával (Carraro és mtsai, 2017a).

A két mobilis genetikai elem között fennálló inkompatibilitást meghatározó SGI1 géneket vagy régiókat többféle megközelítéssel kíséreltük meg behatárolni. Egyrészt az SGI1 deléciós mutánsok jelenlétében vizsgáltuk az IncA/C plazmidok stabilitását, másrészt SGI1 fragmenteket klónoztunk p15a alapú vektorokba, s ezen plazmidok mellett vizsgáltuk a *helper* vesztődését. Mivel az *FlhDC*<sub>SGI1</sub>-nek a *helper* plazmid destabilizálásában betöltött szerepét a korábban említett SGI1-K variánsnál már felvetették, ezért ezt a kérdést további módszerekkel is körüljártuk.

## **8.1 Az R55 stabilitásának vizsgálata SGI1 deléciós mutánsok jelenlétében**

Elsőként az IncA/C plazmidok stabilitását deléciós mutánsunk segítségével vizsgáltuk, amellyel az SGI1 hipotetikus destabilizáló faktorát vagy faktorait kívántuk feltérképezni.

Vizsgálatainkat *E. coli* TG1Nal (Nal<sup>R</sup>) törzsben végeztük. Korábban előállított deléciós mutánsaink (Sm<sup>R</sup>/Sp<sup>R</sup> és Su<sup>R</sup>) mellé konjugációval bejuttattuk az R55 (IncC) plazmidot (Km<sup>R</sup> és Cm<sup>R</sup>) (ld. III/7., IV/1.). Az SGI1-et és *helper* plazmidot egyaránt hordozó telepeket az SGI1-re szelektálva (Nal+Sm+Sp) LB táplevesben növesztettük, majd ugyanilyen

antibiotikumokat tartalmazó táptalajra szélesztettük. A felnőtt telepeket R55-re szelektív (Cm+Km) táptalajra replikáztuk. Meghatároztuk az R55 plazmidot hordozó szubpopuláció arányát az LA+Cm+Km (R55<sup>+</sup>) valamint az LA+Nal+Sm+Sp (összes telep) táptalajokon nőtt telepek számának hányadosaként (5. táblázat).

Törzs*	Mérések száma	Vizsgált telepek száma	R55 <sup>+</sup> populáció
SGI1 wt	18	7652	34,93 ± 21,06%
SGI1Δ <i>flhDC</i> <sub>SGI1</sub>	5	830	35,86 ± 21,67%
SGI1ΔS006-S012	7	3014	58,05 ± 32,16%
SGI1ΔS013-S018	5	3586	100% ± 0%
SGI1ΔS019	1	2166	31,55%
SGI1ΔS020	1	2436	29,12%
SGI1ΔS021	1	1944	44,22%
SGI1ΔS022	1	1921	5,57%
SGI1ΔS023-S026	5	3337	100% ± 0%
SGI1ΔS023-S027	4	4308	100% ± 0%
SGI1ΔS044	6	5659	100% ± 0%

**5. táblázat Az R55 plazmid stabilitásának vizsgálata replika technikával.**

Az R55<sup>+</sup> populáció aránya az R55<sup>+</sup> telepek száma és az összes telepszám hányadosa (átlag±szórás).

\*SGI1 wt vagy deléciós mutánst hordozó *E. coli* TG1Nal + R55 *helper* plazmid.

Megfigyeléseink alapján a vad típusú (wt) SGI1-C-t tartalmazó törzsben az R55 plazmid nagy mértékben vesztődik az SGI1-re szelektív kondíciók mellett. A 10. generációt követően a populáció kb. 35%-ában van csak jelen a helper. Ezzel szemben az SGI1ΔS013-S018, SGI1ΔS023-S026, SGI1ΔS023-S027 és SGI1ΔS044 mutánsokban az R55 plazmid 10 generáció után is stabilnak tűnt, míg az SGI1Δ*flhDC*<sub>SGI1</sub> és az SGI1ΔS006-S012 mutánsok mellett az R55 valamilyen mértékben vesztődött. Az SGI1ΔS019, SGI1ΔS020, SGI1ΔS021 és SGI1ΔS022 mellett az R55 plazmid szintén vesztődött.

Az R55 stabilitását egy másik módszerrel is megvizsgáltuk a különböző SGI1 mutánsok jelenlétében. Ennek a vizsgálati módszernek a lényege, hogy több generáción keresztül vizsgáljuk a plazmidvesztést. Minden passzálás után (ez kb. 20 generáció) titrálással határozzuk meg az R55-t tartalmazó, illetve a plazmidvesztett szubpopuláció hányadát (Harmer és mtsai, 2016), így a plazmidvesztés dinamikája is vizsgálhatóvá válik. Ennek a módszernek előnye, hogy nagyszámú mintát és mintánként több paralelt tudunk egyidőben vizsgálni, míg hátránya a titrálás nagyobb pontatlanságából ered. Ezért amikor ezt a módszert használtuk, a 100. generáció (5. passzálás) után a paraleleket egyenlő arányban összekevertük és a kevert populációt replika *plating* technikával is analizáltuk.

Eredményeink szerint a legtöbb SGI1 mutánsról, melyek mellett az előző kísérletben (10. generáció után) az R55 plazmid még stabilnak mutatkozott, kiderült, hogy 100 generáció elteltével veszik mellőlük a *helper*, bár különböző mértékben. Ezt az 5. passzálás után végzett replika eredményei is megerősítették (6. táblázat). Ez arra utalt, hogy elsőként alkalmazott módszerünk valószínűleg nem volt kellően érzékeny.

Az SGI1ΔS006-S012 mutáns mellett az R55 plazmid nagyobb stabilitást mutatott, bár 100 generáció elteltével az R55 plazmidot hordozó sejtek a baktériumpopuláció 17,48%-ban voltak jelen.

Az SGI1ΔS023-S027 és SGI1ΔS044 mutánsok mellett az R55 vesztődése nem mutatott számottevő különbséget az wt SGI1-t hordozó törzsben mért R55 vesztődéshez képest.

Mindössze egyetlen SGI1 mutáns mellett, a SGI1ΔS013-S018-t hordozó törzsben maradt 100%-ban stabil 100 generáció után is az R55 *helper*.

Donortörzs*	R55 <sup>+</sup> populáció 20 generáció (titrálás)	R55 <sup>+</sup> populáció 100 generáció (titrálás)	Vizsgált telepek száma (replika)	R55 <sup>+</sup> populáció 100 generáció (replika)
SGI1 wt	19,21 ± 23,11%	0%	1250	0%
SGI1ΔS006-S012	85,42 ± 13,90%	36,62 ± 9,57%	469	17,48%
SGI1ΔS013-S018	104,70 ± 19,44%	99,14 ± 25,29%	400	100%
SGI1ΔS023-S027	10,82 ± 11,03%	0%	629	0%
SGI1ΔS044	19,69 ± 9,69%	0%	396	0%

**6. táblázat Az R55 plazmid stabilitásának vizsgálata titrálós módszerrel és replika technikával.**

Az R55<sup>+</sup> populáció aránya (%) az R55<sup>+</sup> telepek száma és az összes telepszám hányadosa. A titrálási módszerrel meghatározott R55-re szelektív (LA+Sm+Sp+Cm+Km) és nem szelektív (LA+Sm+Sp) titerek arányából kiszámoltuk ki az R55<sup>+</sup> populáció arányát 20 és 100 generáció után. A csoportonként 4 parallel mintát 100 generáció után összekevertük, majd replika technikával meghatároztuk az R55<sup>+</sup> populáció arányát.

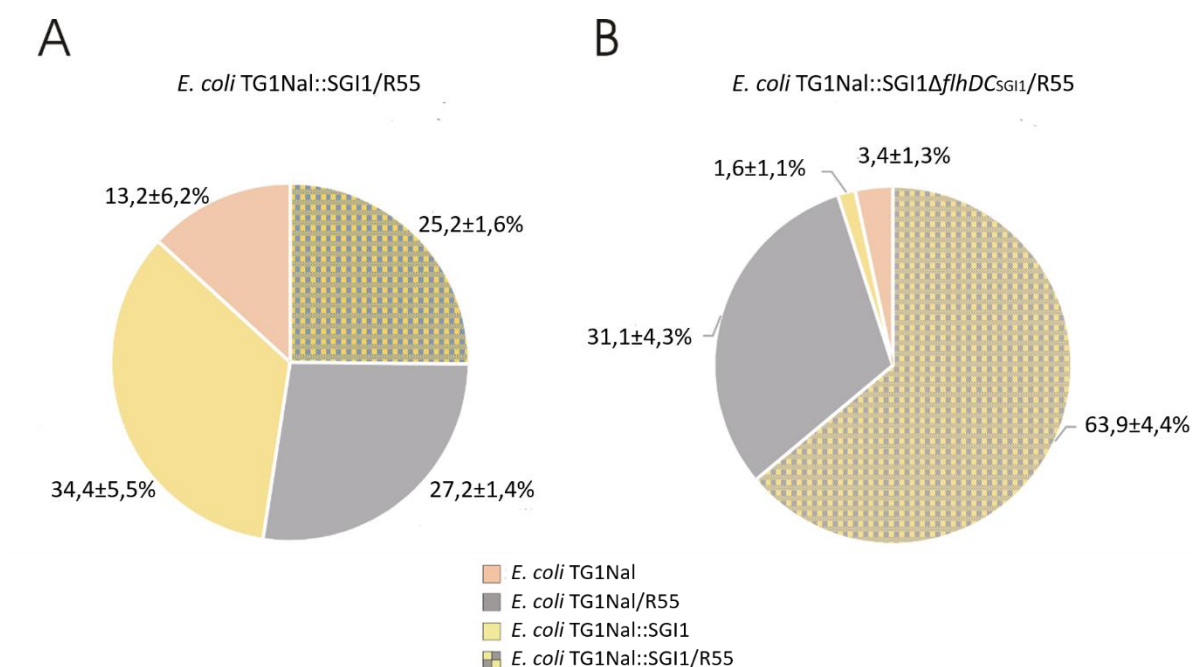
\*SGI1 wt vagy SGI1 mutánst hordozó *E. coli* TG1Nal + R55 *helper* plazmid.

Ugyan a *xis*-S005 közötti régiót érintő deléciós SGI1 mutánsokat szintén megvizsgáltuk ezzel a módszerrel, azonban ezekről a mutánsokról kiderült, hogy az SGI1 olyan szintű instabilitását okozzák, hogy emiatt együttesen nem fenntarthatók az IncA/C plazmidokkal (Szabó és mtsai, előkészületben), így ezekkel a módszerekkel nem vizsgálható mellettük az R55 stabilitása. Mint kiderült, a *xis* és S005 közötti szakaszon az SGI1 saját replikációs régiója van, melynek esetleges szerepét az SGI1-IncA/C plazmidok között fennálló inkompatibilitásban egy más megközelítéssel, plazmidokba klónozott fragmentek vizsgálatával kizártuk (ld. IV/8.3).



## 8.2 Az FlhDC<sub>SGI1</sub> szerepének vizsgálata az IncA/C plazmidok stabilitásában

Az R55 plazmid SGI1-K variáns mellett tapasztalt stabil fennmaradását a szerzők a transzkripció aktivátor gén *flhDC*<sub>SGI1</sub> hiányával magyarázták (Harmer és mtsai, 2016), ezért és a korábbi kísérleteinkből kapott, ennek némiképp ellentmondó adataink miatt az aktivátor R55 fennmaradására gyakorolt hatását egy újabb vizsgálati módszerrel. Szelekciómentes környezetben vizsgáltuk a kétféle mobilis elem stabilitását az R55 *helper* és a wt (22. A ábra) vagy a  $\Delta flhDC$  mutáns (22. B ábra) SGI1-t hordozó baktérium populáción belül. 8 óra növesztés után a  $10^5 \times$  hígításból szélesztettünk 100-100  $\mu$ l kultúrát nem szelektív (LA), SGI1-re szelektív (LA+Sm+Sp), R55-re szelektív (LA+Cm+Km) és mindkét elemre szelektív (LA+Sm+Sp+Cm+Km) táptalajokra.



**22. ábra** Az SGI1 és R55 eloszlása a baktériumpopulációban 8 óra nem szelektív inkubáció után.

Az SGI1 és R55 inkompatibilitásának megnyilvánulása nem szelektíven növesztett baktériumpopulációban vad típusú R55 wt és vad típusú SGI1-C (A) illetve mutáns SGI1 $\Delta flhDC$ <sub>SGI1</sub> (B) jelenlétében. Az R55 wt plazmid stabilabb az SGI1 $\Delta flhDC$ <sub>SGI1</sub> jelenlétében. A vizsgálat során a szelektív tápközegben ON felnövesztett, így mindkét genetikai elemet hordozó *E. coli* TG1Nal baktériumtörzseket  $10^5 \times$  hígítás után, a baktériumszuspenzióból 100  $\mu$ l-t átoltva, 8 órán át nem szelektív LB-ben növesztettük. Ezután a  $10^5 \times$  hígításból 100-100  $\mu$ l-t szélesztettünk LB lemezekre, majd replika technikával megvizsgáltuk a felnőtt telepeket. A körcikkek egyes értékei az egyes szubpopulációk %-os arányának átlagát és szórását reprezentálják (n=4).

Eredményünk alapján a wt SGI1 stabilabbnak bizonyult, mint az R55 plazmid. A telepek egy kisebb hányada (átlagosan a populáció 13,2%-a) mindkét elemet elvesztette, míg a populáció kb. negyede hordozta mind az SGI1-et, mind a *helper* plazmidot. Az SGI1 $\Delta flhDC$ <sub>SGI1</sub> deléciós mutáns esetén ezek az arányok megváltoztak. A mindkét genetikai

elemet együttesen hordozó szubpopuláció aránya jelentősen növekedett (átlagosan a populáció 63,9%-a). Ezzel szemben csak az SGI1-et hordozó, illetve a mindkét elemet elvesztő szubpopulációk aránya nagy mértékben lecsökkent, miközben az SGI1-vesztett, de R55-t tartalmazó szubpopuláció hasonló arányban volt jelen a wt. és a mutáns esetén is.

Úgy tűnik tehát, hogy az SGI1 $\Delta$ *flhDC*<sub>SGI1</sub> és az IncC plazmid könnyebben képesek együttesen fennmaradni, ami alátámasztja az SGI1-K variánssal kapcsolatos megfigyeléseket is (Harmer és mtsai, 2016), azonban az egyes elemek szegregációja ebben az esetben is megfigyelhető. Eredményeink azt mutatják, hogy az *flhDC*<sub>SGI1</sub> deléciója a plazmid veszteségét ugyan akadályozta, az SGI1 vesztődését nem befolyásolta.

Feltételeztük, hogy az SGI1 $\Delta$ *flhDC*<sub>SGI1</sub>-et hordozó baktériumtörzsben megszűnhetett akár egy olyan hatás is, amely az IncA/C plazmid belépését akadályozhatja, ezért megvizsgáltuk az R55 bevitel hatékonyságát az *flhDC*<sub>SGI1</sub> (S006-S007) régiót érintő deléciós mutánsokat hordozó recipiensekbe ( $\Delta$ *flhDC*<sub>SGI1</sub> és  $\Delta$ S006-S012).

A vizsgálathoz egy olyan R55 plazmidot használtunk, amelynek konzervált gerince azonos a vad típusú R55 plazmidéval, viszont kizárólag kloramfenikol/florfenikol rezisztenciát kódol (R55 $\Delta$ Tn6187).

Azt tapasztaltuk, hogy a wt SGI1-et hordozó recipiens törzsbe kb. 10<sup>-3</sup>-as gyakorisággal tudtuk konjugáltatni a *helper* plazmidot, míg az *flhDC*<sub>SGI1</sub>-et érintő deléciós mutánsok esetén egy nagyságrenddel nagyobb volt az R55 plazmid konjugációs frekvenciája (7. táblázat). Az SGI1 $\Delta$ S006-S012 mutánst hordozó törzsbe az R55 plazmid transzfer frekvenciája háromszor magasabb volt, mint az SGI1 $\Delta$ *flhDC*<sub>SGI1</sub> mutánst hordozó törzsbe. Ebben a mutánsban az *flhDC*<sub>SGI1</sub> mellett a *traHG* teljes operonja (S012-S010), illetve az S008 és S009 ORF-ok szintén hiányoznak.

Recipiens törzs*	Donor titer (TG90/R55) ( $\times 10^9$ /ml)	Recipiens titer ( $\times 10^9$ /ml)	R55 transzkonjugáns titer ( $\times 10^7$ /ml)	R55 konj. frekvencia transzkonjugáns/recipiens
SGI1 wt	2,15	4,95	1,35	$2,76 \times 10^{-3} \pm 9,73 \times 10^{-4}$
SGI1 $\Delta$ <i>flhDC</i> <sub>SGI1</sub>	1,2	5,9	16	$2,7 \times 10^{-2} \pm 8,33 \times 10^{-3}$
SGI1 $\Delta$ S006-S012	3,4	6,35	62	$9,76 \times 10^{-2} \pm 4,66 \times 10^{-3}$

**7. táblázat Az R55 konjugációjának vizsgálata SGI1-et hordozó törzsekbe.**

*E. coli* TG90/R55 $\Delta$ Tn6187 törzset kereszteztük a recipiens törzsekkel 6 órán át 37°C-on LA lemezeken. A transzfer frekvenciákat az R55 $\Delta$ Tn6187 transzkonjugáns és a recipiens titerek (CFU/ml) hányadosaként adtuk meg. \*Recipiens törzsek: *E. coli* TG1Nal::SGI1-C wt/ $\Delta$ .

Az eddigi eredmények alapján indokoltnak éreztük, hogy az FlhDC<sub>SGI1</sub>-et expresszáló plazmid (pGMY6) mellett szintén megvizsgáljuk az R55 plazmid stabilitását. A kísérletet



titrálós módszerrel végeztük *E. coli* TG1Nal R55 $\Delta$ Tn6187 plazmidot hordozó törzsben. Az R55 plazmid kb. 100 generáció után is stabilan jelen volt a populációban, így az FlhDC<sub>SGII</sub> egyedüli szerepét az R55 destabilizációjában kizárhattuk.

Összességében eredményeink azt mutatták, hogy az SGI1 $\Delta$ flhDC<sub>SGII</sub>-et hordozó törzsben a *helper* plazmid stabilabban fenn tudott maradni, bár szegregációja nem szűnt meg. Előfordulhat, hogy az FlhDC<sub>SGII</sub> valamilyen módon az IncC plazmid bejutását akadályozza a baktériumsejtbe, de az sem kizárt, hogy expressziója elősegíti a *helper* vesztődését. Önmagában az FlhDC<sub>SGII</sub> expressziója mellett az R55 plazmid nem szegregált, stabilan fenn tudott maradni a populációban, tehát az általunk tapasztalt hatást az FlhDC<sub>SGII</sub> feltehetően egy másik SGI1 faktoron keresztül, azaz csak közvetett módon okozhatja.

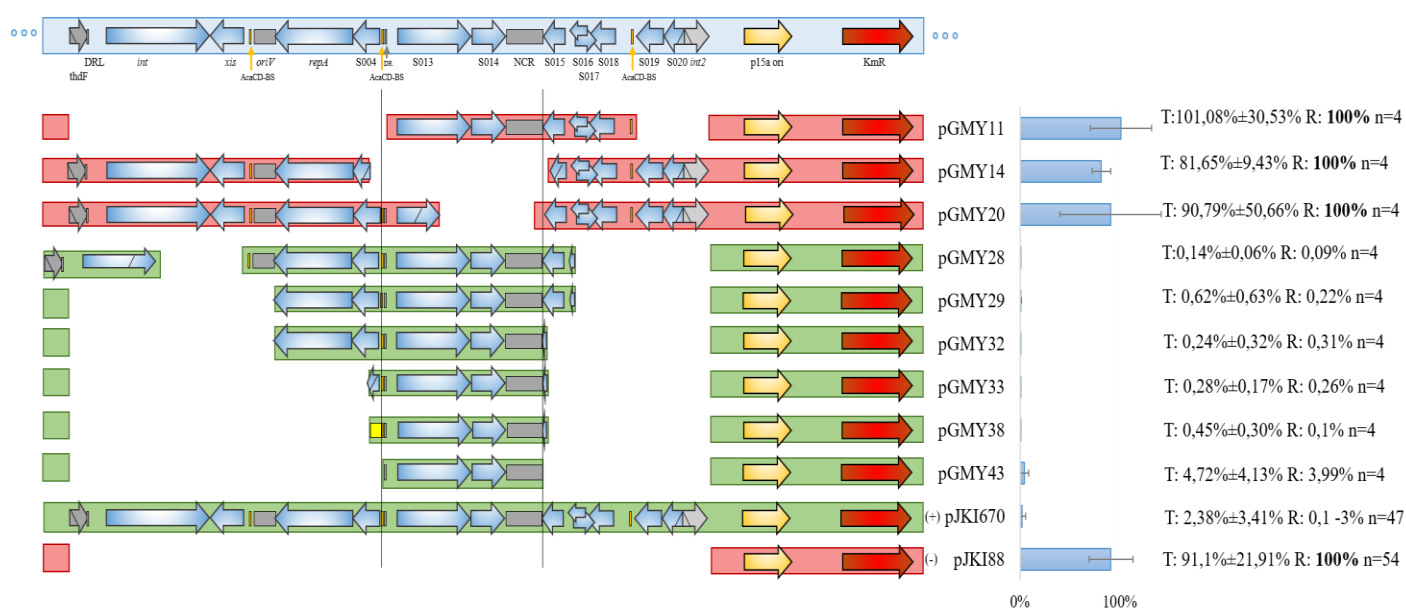
### 8.3 Az R55 stabilitásának vizsgálata SGI1 fragmenteket hordozó plazmidokkal

Az előző vizsgálatunk alapján (ld. IV/8.1) egyedül az SGI1 $\Delta$ S013-S018 mutáns mellett bizonyult 100%-ban stabilnak az R55 plazmid. Ez alapján a keresett SGI1 által kódolt, IncA/C plazmidokat destabilizáló faktor ebben a régióban található. Korábban számos SGI1 fragmentet hordozó plazmidot hoztunk létre (Hegyí és mtsai 2017), melyek közül a pJKI670-ről (KmR) igazoltuk, hogy mellette az R55 plazmid, illetve annak CmR/FloR variánsa, az R55 $\Delta$ Tn6187, melyet a kísérlet kivitelezéséhez megfelelő rezisztenciája miatt választottunk, szintén instabil. A pJKI670 a következő génkészlettel rendelkezik: *int*, *xis*, *oriV*, *repA*, S004, S013-S018, illetve S019 3' vége, tehát hordozza azt a régiót (S013-S018) is, amelyet a IV/8.1 fejezetben bemutatott eredmények alapján a destabilizációval gyanúsíthattunk.

Az SGI1 S004 és S013 *upstream* régióiban egy-egy DR szekvencia található, amely 31 bp hosszú és egymástól 2 bp-ban különbözik. A pJKI670-ben a két DR szekvencia között oly módon történt deléción, hogy a megmaradt kópia az S004 *upstream* régiójának DR szekvenciájából eredeztethető (Kiss és mtsai, 2012). A pJKI670-ben a deléción miatt az S005-S012 szakasz hiányzik, és a gének irányultsága miatt az S013-S014 operontól *upstream* egy hibrid S004-S013 *upstream* régió helyezkedik el, amelyet az S004 DR szekvenciája határol (23. ábra). A pJKI670 nem hordozza az SGI1 S020-S044 régióját sem, így az IncA/C plazmidok esetleges destabilizációjával eddig összefüggésbe hozott gének egyikét sem (pl. T/A rendszer génjei, *flhDC*<sub>SGII</sub> mesterregulátor komplex, az „*entry exclusion*” kikerülését elősegítő *traG*), jelenlétében mégis nagymértékű R55 vesztés tapasztalható.

Az inkompatibilitást okozó SGI1 által kódolt faktor(ok) térképezését a replikával kiegészített Harmer-féle passzási módszerrel vizsgáltuk (ld. III/12.), melyhez a pJKI670 különböző deléciós származékait használtuk. A kísérleteket a deléciós plazmidokra való antibiotikus szelekció mellett (Km) végeztük.

A pJKI670 esetén 100 generációt követően már csak a populáció 0,1-3%-a hordozta a *helper* plazmidot, míg az üres pJKI88 jelenlétében (negatív kontroll) az R55 vesztődése nem volt tapasztalható, tehát 100%-ban stabil maradt. Vizsgálataink azt mutatták, hogy az R55 azon deléciós plazmidok mellett maradt fenn stabilan (100%-ban), amelyekben deléciók érintették a hibrid S004-S013 *upstream* vagy S013-S015 közötti régiókat (23. ábra).



**23. ábra A pJKI670 és deléciós származékainak sematikus térképe és R55-t destabilizáló hatása.**

A piros színnel jelölt SGI1 szakaszokat tartalmazó plazmidok mellett az R55 stabil volt, míg a zöld színnel jelölt szakaszokat tartalmazó plazmidok mellett az R55 vesztődése volt megfigyelhető. T: titrálási kísérletből származó adatok, R: replika technikával kapott adatok. Mindkét mérés az ötödik passzázból (100 generáció R55-re nem szelektív médiumban történt passzálas után) történt és az R55<sup>+</sup> sejtek arányát jelzi az összes élő sejt %-ában. n=paralellek száma a titrálási kísérletben. (+): pozitív kontroll, (-): negatív kontroll. Sárga négyzet: P<sub>S012</sub>. AcaCD-BS: AcaCD kötőhely. A plazmid által hordozott SGI1 géneket kék nyilak jelzik a nekik megfelelő orientációval. A p15a rep ori-t sárga, míg a KmR gént piros nyíl jelöli.

A pJKI670-ból képzett pGMY14 (*PstI* deléció) és pGMY20 (*BsaBI* deléció) plazmidok mellett az R55 stabillá vált, ami arra utal, hogy a keresett faktor a deléciókkal érintett régióban található. Mindkét deléció érinti az S013-S014 géneket és az S014 és S015 között elhelyezkedő nem kódoló régiót (*non-coding region*, NCR). Azért, hogy megerősítsük, hogy ezeknek a géneknek és az NCR-nek lehet szerepe az IncA/C plazmidok destabilizálásában az S013-S018 régiót az S013 és S018 *upstream* szekvenciákkal együtt klónoztuk pJKI88-ba (pGMY11), amely mellett azonban az R55 stabil maradt. A pGMY11 hordozza a teljes

S013-S018 régiót a feltételezett promóter elemekkel együtt, az S013 promóter régiójától *upstream* elhelyezkedő DR szekvenciát azonban már nem tartalmazza. Mindezek alapján úgy tűnik, hogy az R55 destabilizálásához a DR szekvencia vagy annak közvetlen környezete is szükséges.

A következő konstrukció (pGMY33) ennek megfelelően egy viszonylag szűk régiót hordozott, az S013 és S014 ORF-okat, az NCR-t, illetve az S013 előtti DR-t és az S004 *upstream* régiójának egy kisebb szakaszát. A pGMY33 mellől az R55 plazmid hasonló mértékben vesztődött ( $0,28 \pm 0,17\%$ ), mint a pozitív kontrollként használt pJKI670 mellől. Mivel az eredeti SGI1-en az S012 és S013 gének között megtalálható DR szekvencia és környezete kicsit eltér a pGMY33-étól, ezért ahhoz, hogy kizárjuk az S004 *upstream* régiójának esetleges szerepét a folyamatban, kicseréltük ezt a DNS szakaszt az S012 *upstream* régiójára (pGMY38). A pGMY38 jelenlétében az R55 plazmid szintén nagymértékben vesztődik. A pJKI670-hez hasonlóan 100 generációt követően csak a baktériumpopuláció kb. 0,1%-ban maradt meg az R55. A pGMY38-ban található SGI1-régiót tovább rövidítettük a DR szekvencia előtti, azaz az S012 *upstream* régió és az S015 3' végének eltávolításával. Az így kapott pGMY43-ban már csupán a DR maradt meg az S013 *upstream* elemekkel, az S013, S014 gének és az ettől *downstream* elhelyezkedő NCR. Ezen plazmid jelenlétében az R55-t tartalmazó sejtek aránya kb. 4%-ra csökkent 100 generáció után. Ez enyhe stabilitás növekedést jelent a pozitív kontrollhoz képest. Ennek oka lehet az is, hogy az S012 *upstream* régiójában található és e konstrukcióból már eltávolított AcaCD kötőhely a DR szekvenciához való közelsége folytán (4 bp) befolyásolhatja a destabilizációs folyamatot, amennyiben a DR szekvencia egy másik faktor kötőhelyeként funkcionál.

A pJKI670-ben az S013-S018 régión kívül két eddig nem vizsgált egység is megtalálható, az *int-xis* rendszer, illetve a feltételezett replikációs rendszer, amelyeket az IV/8.1 fejezetében használt módszerrel nem tudtunk megvizsgálni. Az *int-xis*, valamint a replikációs régiót érintő deléciós plazmidokkal (pGMY28, pGMY29, pGMY32 és pGMY33) kapott eredmények alapján biztosan állíthatjuk, hogy a fentebb említett két rendszer nem vesz részt az SGI1 és IncA/C plazmidok közötti inkompatibilitás kialakításában, hiszen a két egység hiánya nem okozott változást az R55 stabilitásában. A két mobilis elem között fennálló inkompatibilitás tehát nem replikációs rendszereik interferálódásából fakad. Továbbá az *int-xis* rendszer és a replikációs régió a pGMY20 plazmidban ép, viszont az R55 plazmid stabilan fennmarad mellette, ami szintén igazolja azt, hogy ezek a rendszerek nem destabilizálják a *helper* plazmidot.

A pGMY11 és pGMY33 plazmidokkal kapott eredmények összevetése alapján, tekintettel a pGMY14 és pGMY20 deléciós plazmidokkal kapott eredményekre is, azt mondhatjuk, hogy az általunk keresett inkompatibilitást okozó faktor az S013 gén feltételezett promóter régiójától *upstream* helyezkedik el, ahol egy DR szekvencia figyelhető meg. Az eredmények alapján azonban kizárható ennek egyedüli szerepe, mivel a pGMY20 mellett stabilizálódott az R55, ez a plazmid azonban tartalmazza ezt a régiót. Összeségében a pGMY38 plazmidot tekinthetjük a legrövidebb, teljes mértékben funkcionális szakasznak, így a továbbiakban a pGMY38 finom térképezésével folytattuk az analízist.

#### **8.4 A S013-S014 operon promóter régiójának vizsgálata**

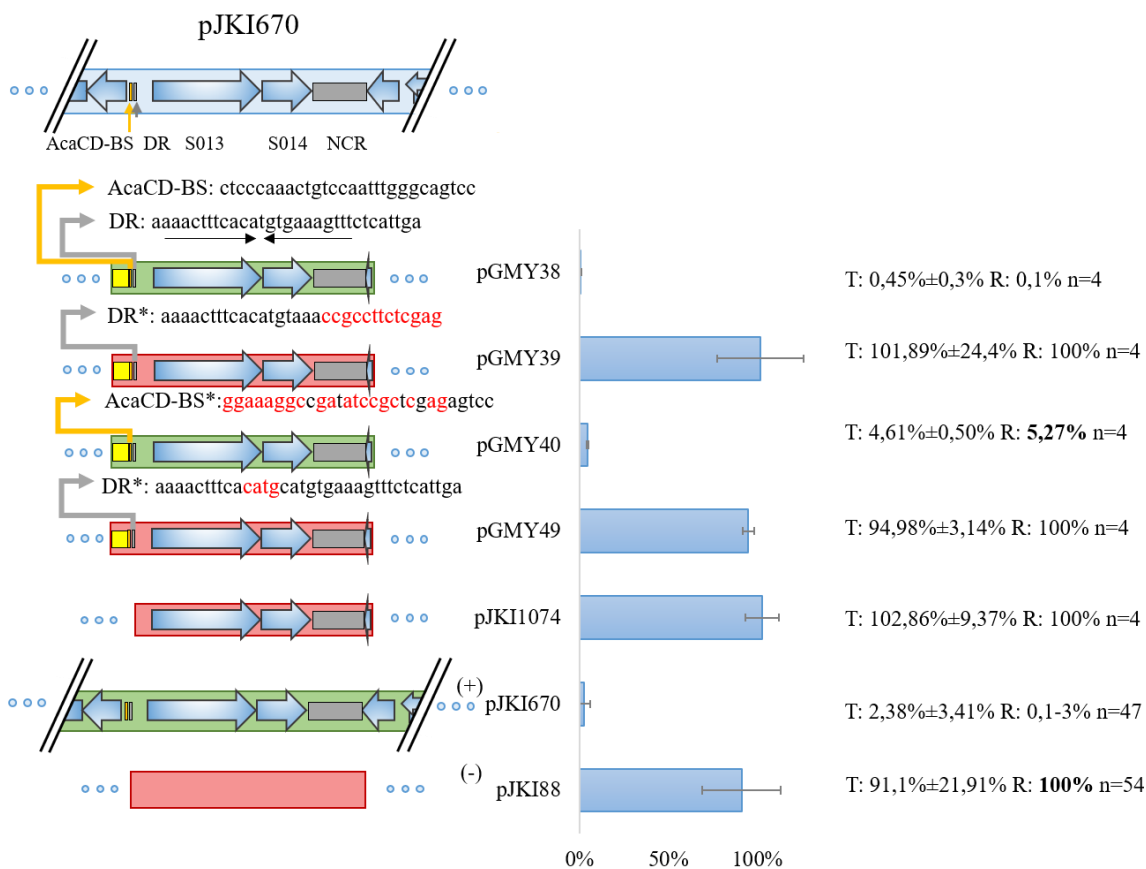
A IV/8.3 fejezetben tárgyalt eredmények alapján azt feltételeztük, hogy vagy az S013-S014 operon expressziója, vagy az operon feltételezett promóterétől *upstream* pozícióban elhelyezkedő *cisz*-elem(ek) jelenléte lehet fontos az az R55-tel való inkompatibilitás kialakításában. Mivel előző vizsgálatunkban úgy tűnt, hogy az S004 és S012 *upstream* régióinak cseréje (pGMY33 és pGMY38) nem befolyásolta a folyamatot, így az *upstream* régiókban található közös *cisz*-elemekre (DR és AcaCD kötőhely) fókuszáltunk vizsgálatainkban. Ezt a pGMY11-gyel végzett korábbi mérésünk is megerősítette, hiszen a plazmid jelenlétében az R55 plazmid stabilnak mutatkozott. A pGMY11 hordozza az S013-S018 ORF-okat és az operonok feltételezett promóter régióit, viszont nem hordozza a már említett *cisz*-elemeket.

Azért, hogy megvizsgáljuk feltevésünket, olyan pGMY38 származékokat hoztunk létre, melyekben mutagenizáltuk a DR szekvenciát (pGMY39 és pGMY49) vagy az AcaCD kötőhelyet (pGMY40).

Azt tapasztaltuk, hogy az AcaCD kötőhelyben végzett módosításnak nem volt számottevő hatása. A pGMY40 mellett az R55 plazmid továbbra is instabil maradt, 100 generáció után a populációnak mindössze 5,27%-a tartalmazta az R55-t (24. ábra), hasonlóan a pGMY43-hoz, ahol szintén kisfokú stabilitásnövekedést tapasztaltunk előző vizsgálatunkban.

Az SGI1-en két kópiában előforduló DR szekvenciák szimmetrikus felépítésűek, 11 bp hosszú inverz *repeat* (IR) régiót tartalmaznak, ami akár egy eddig ismeretlen funkciójú fehérje kötőhelyeként is szolgálhat. Ezt a DR szekvenciát módosítottuk kétféle módon. A DR egyik IR régióját elrontottuk (pGMY39), valamint a DR közepén található *AflIII* restrikciós hasítóhelyet feltöltöttük, így létrehoztunk egy olyan plazmidot (pGMY49), melyben az IR szekvenciák további két-két bp-ral kiegészültek. Mindkét konstrukció mellett az R55 plazmid teljes stabilizálódását tapasztaltuk (24. ábra). Eredményeink tehát igazolták, hogy a DR meg-

létének nélkülözhetetlen szerepe van az R55 destabilizálásában. Az S013 feltételezett promóter régiójának részleges deléciójával létrehozott plazmid (pJKI1074) mellett az R55 szintén stabilizálódott, ami tovább erősíti felvetésünket.



## 24. ábra Az R55 stabilitását befolyásoló S013-S014 operontól *upstream* pozícióban elhelyezkedő *cis*-elemek vizsgálata SGI1 fragmenteket hordozó plazmidokkal.

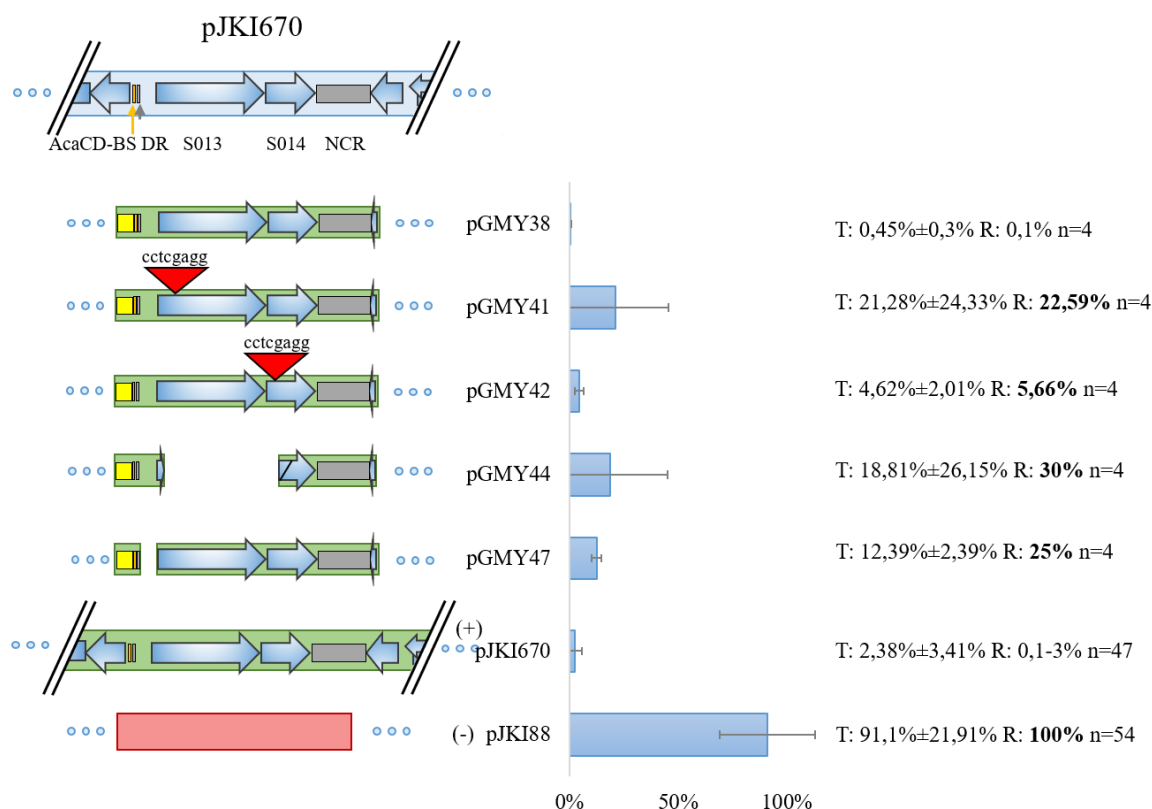
A pGMY38 DR régiójában létrehozott modifikációk és deléciók az R55 stabilizálódását okozták, míg az AcaCD kötőhely (AcaCD-BS) módosítása nem szünteti meg az R55 vesztődését. Az ábrán a könnyebb áttekinthetőség érdekében csak az SGI1-ből származó szakaszt tüntettük fel. A piros betűk az adott szekvenciaszintű változásokat reprezentálják, a DR-ben megtalálható inverz *repeat*-eket fekete nyilak jelölik. A zölddel jelölt plazmidszekvenciák a R55 plazmidot destabilizáló SGI1 fragmenteket reprezentálják, míg a piros színnel jelölt SGI1 fragmentek mellett a R55 plazmid stabil maradt. T: titrálási kísérletből származó adatok, R: replika adatok az ötödik passzázsból 100 generáció után, n=paralelek száma a titrálós kísérletben. (+): pozitív kontroll, (-): negatív kontroll. Sárga négyzet: P<sub>S012</sub>. A plazmid által hordozott SGI1 géneket kék nyilak jelzik a nekik megfelelő orientációval.

## 8.5 A S013 és S014 fehérjék szerepének vizsgálata

Mivel az S013-S014 operon *upstream* régiójában fekvő DR szekvencia szükségesnek bizonyult az R55 destabilizálásában, ezért azt feltételeztük, hogy az operon által kódolt gének szintén funkcionálisak lehetnek, amennyiben a DR szekvencia *cis*-elemként valamilyen szabályozási funkciót lát el, pl. szükséges az operon expressziójához.

Ahhoz, hogy megvizsgáljuk az S013 és S014 gének által kódolt fehérjék szerepét az inkompatibilitásban, az S013 (pGMY41) és az S014 (pGMY42) génekben *frameshift* mutációkat hoztunk létre egy 8 bp hosszú *XhoI*-linkernek egy-egy hasítóhelyre történő beillesztésével (25. ábra). Emellett olyan deléciós mutánsokat is létrehoztunk, amelyek az S013 feltételezett promóterét érintik (pGMY47) vagy az S013-S014 operonban egy nagyobb deléciót hordoznak (pGMY44). A korábbiaknak megfelelően ezúttal is az R55 stabilitását vizsgáltuk az újonnan létrehozott plazmidok jelenlétében titrálós módszerrel, illetve az 5. passzálas után replika technikával.

Az összes mutánsra elmondható, hogy csak kis mértékben növelte az R55 plazmid stabilitását (25. ábra). Az S014 *frameshift* mutációja alig, míg a többi mutáns kicsit jobban növelte a *helper* stabilitását, de 100. generációt követően az R55 a populáció maximum 30%-ában volt jelen.



## 25. ábra Az S013 és az S014 fehérjék szerepének vizsgálata az R55 destabilizációjában.

Sem az S013, sem az S014 frameshift mutációja vagy részleges deléciója nem szünteti meg az R55 destabilizációját. A piros háromszögek a *XhoI*-linker (cctcgagg) helyét jelezik a *frameshift* mutáns plazmidokon, a zöld színnel jelölt konstrukciók mellett R55 plazmid instabil. A piros színnel jelölt pJKI88 üres vektor mellett az R55 stabil. T: titrálási kísérletből származó adatok, R: replika adatok az ötödik passzázsból 100 generáció után, n=parallelek száma a titrálós kísérletben. (+): pozitív kontroll, (-): negatív kontroll. Sárga négyzet: P<sub>S012</sub>. AcaCD-BS: AcaCD kötőhely. A p15 ori és KmR az ábrán nincs feltüntetve a könnyebb átláthatóság érdekében A plazmid által hordozott SGI1 géneket kék nyilak jelzik a nekik megfelelő orientációval.

Eredményeink alapján azt mondhatjuk, hogy az S013-S014 ORF-ok által kódolt fehérjék nem esszenciális faktorai az inkompatibilitásnak, hiszen a destabilizáló hatás, bár némileg gyengébben, de hiányukban is megmaradt.

## 8.6 A S014 és S015 közötti nem kódoló régió vizsgálata

Mivel a DR szekvencia megléte önmagában nem elegendő az inkompatibilitás kialakításához, az S013 és S014 fehérjék szerepét pedig kizártuk, így joggal feltételezhetjük, hogy az R55 plazmidot destabilizáló esszenciális faktor az S014 és S015 ORF-ok között található NCR-ben található, hiszen a pGMY20 mellett az R55 plazmid teljesen stabilnak bizonyult. Ebben a deléciós mutánsban az S014 ORF-on kívül csak az S014 és S015 gének közötti NCR hiányzik. Feltételezésünket megerősítette a pGMY34 plazmiddal kapott eredményünk is, amely mellett az R55 stabilizálódott (26. ábra). A pGMY34 a pozitív kontrollként használt pGMY38-tól csak annyiban különbözik, hogy az S014 ORF-ot követő szakaszt nem hordozza.

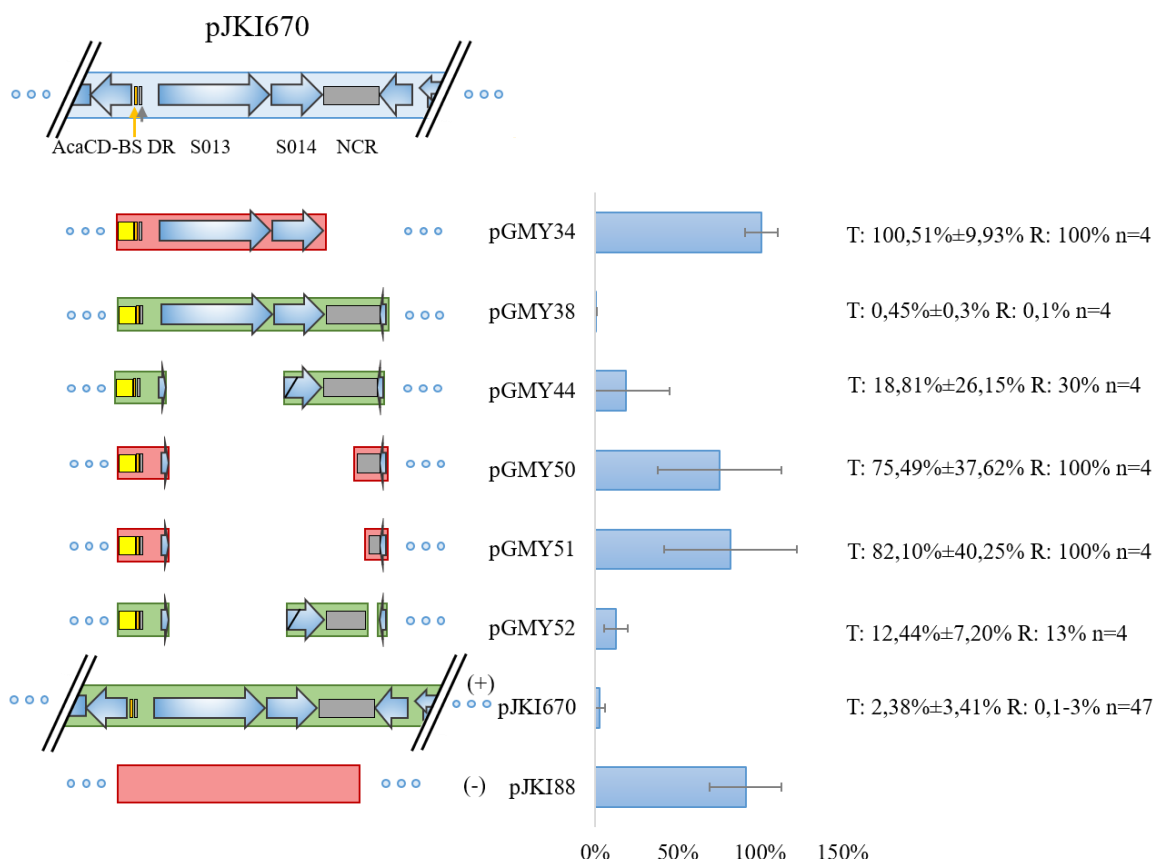
Ebben a régióban nem találtunk olyan motívumot, amelyet meggyanusíthatnánk az inkompatibilitással kapcsolatban, csupán az S015 ORF-hoz közel találtunk egy rövid IR szekvenciát. A régió vizsgálatához ezért további deléciós plazmidokat hoztunk létre (pGMY44, pGMY50, pGMY51 és pGMY52), amellyel az NCR funkcionális *cis*-elemét kívántuk térképezni a korábban alkalmazott módszerrel.

A pGMY50 és pGMY51 plazmidok mellett, amelyekben az NCR S014-hez közeli szakaszából eltávolítottunk 242, illetve 358 bp-nyi szakaszt, az R55 plazmid kissé stabilizálódni látszott. A pGMY44 és pGMY52 plazmidok között az egyetlen különbség, hogy a pGMY52-ben az NCR is tartalmaz egy rövidebb deléciót, amellyel a régióban talált egyetlen gyanúsított inverz *repeat* motívumot (egy S015 ORF-hoz közeli 56 bp-nyi szakaszt) eltávolítottuk, de mivel a pGMY52 plazmid mellett az R55 instabil maradt, így ennek szerepe kizárható.

Elmondhatjuk, hogy ha az NCR sérül vagy hiányzik, az R55 plazmid stabillá válik. Az NCR-t jelenleg 358 bázispárnnyira tudtuk leszűkíteni, de a destabilizációban résztvevő *cis*-elem pontos méretét és funkcióját egyelőre nem tudtuk meghatározni.

Összességében tehát az SGI1-en két olyan *cis*-elemet sikerült azonosítanunk, amelyek együttes jelenléte szükséges az IncA/C plazmidok destabilizációjához. Az inkompatibilitás megszűnik az SGI1 és az IncC *helper* között, amennyiben a DR szekvencia sérül (ld.

pGMY39 és pGMY49, 24. ábra) vagy hiányzik (ld. pGMY11 és pJKI1074, 23. és 24. ábra). Ha a másik *cis*-elemet eltávolítottuk, az R55 plazmid szintén stabilizálódott (ld. pGMY34, pGMY50 és pGMY51, 26. ábra). Vizsgálataink alapján az S013 és S014 fehérjéknek is lehet szerepe az inkompatibilitás kialakításában, bár eltávolításuknak nincsen drasztikus hatása (ld. 25. ábra). Az AcaCD kötőhely eltávolítása szintén nem jár az R55 plazmid stabilizálódásával (pGMY40 és pGMY43, 24. és 23. ábra), de csekély mértékben csökkentette a plazmid vesztődését.



**26. ábra** A S014 és S015 gének között elhelyezkedő NCR egy szakasza szintén esszenciális a R55 destabilizációjához.

A piros színnel jelölt konstrukciók mellett az R55 stabil volt, míg a zöld színnel jelöltek mellett a R55 vesztődése volt megfigyelhető. T: titrálási kísérletből származó adatok, R: replika adatok az ötödik passzázsából 100 generáció után, n=parallelek száma a titrálós kísérletben. (+): pozitív kontroll, (-): negatív kontroll. Sárga négyzet: P<sub>S012</sub>. AcaCD-BS: AcaCD kötőhely. A plazmidok által hordozott SGI1 géneket kék nyilak jelzik.



## V. Diskusszió

Dolgozatomban az SGI1 és IncA/C plazmidok közötti sokrétű molekuláris kapcsolatokat kívántam feltárni. Doktori tanulmányaim során többek között meghatároztuk az SGI1 kivágódásának minimális feltételeit, azonosítottunk egy SGI1 által kódolt FlhDC homológ mesterregulátort, amely rokonságot mutat az IncA/C plazmidok AcaCD mesterregulátorával. Megvizsgáltuk a mesterregulátorok funkcióit és aktivitásukat az AcaCD rezszonzív promótereken, illetve jellemeztük a regulátorok által szabályozott promótereket a transzkripciós starthelyek meghatározásának révén. Emellett feltérképeztük a két genetikai elem között fennálló inkompatibilitást okozó SGI1 faktorokat.

### 1. A SGI1 kivágódásának és konjugatív transzferének feltételei

Az SGI1 egy tipikus IME, önmagában nem képes a horizontális transzferre, mobilizációjához egy IncA/C *helper* plazmid jelenléte szükséges. A *helper* plazmid biztosítja az SGI1 számára a konjugációs apparátust, bár ennek egyes elemeivel homológ géneket azonosítottak az SGI1-en is (*traN*, *traG* és *traH*), amelyekről bebizonyosodott, hogy az SGI1 mobilizációjának hatékonyságát képesek növelni az IncA/C plazmidok konjugációjával szemben (Carraro és mtsai, 2017a).

Egyes GI-knél és az IncA/C plazmidoknál számos operont, illetve gént, de elsősorban a konjugációs géneket az FlhDC családba tartozó regulátorok szabályozzák. Az SGI1 konjugációjának előfeltétele a genomi sziget kivágódása a bakteriális kromozómáról. Az SGI1 kivágódását és az integrációját a szigeten kódolt  $\lambda$  tirozin rekombinázorok családjába tartozó integráz katalizálja, melynek expressziója konstitutív promóterről történik és nem áll az FlhDC homológ AcaCD szabályozása alatt. A sziget integrációjával ellentétben a kivágódáshoz szükség van egy RDF (Xis) fehérjére is, a *xis* expresszióját azonban a *helper* plazmid által kódolt AcaCD mesterregulátor szabályozza promótere aktiválása révén (Kiss és mtsai, 2015). Ilyen tekintetben az SXT ICE-k Int/Xis rendszerétől különbözik, ahol mind az *int*, mind a *xis* SetCD szabályozás alatt áll (Burrus és Waldor, 2003).

Kimutattuk, hogy az SGI1 kivágódásának alapfeltétele az AcaCD kötőhely megléte a *xis* promóterében, amely megerősíti, hogy a *xis* az AcaCD közvetlen szabályozása alatt áll. Minden más általunk generált SGI1 mutáns képes volt a kivágódásra és konjugációra AcaCD, illetve az a R55 plazmid jelenlétében.

Összegzésként elmondhatjuk, hogy az SGI1 Int/Xis helyspecifikus rekombinációs rendszer működése során az *int* expressziója konstitutív, amelyet nem befolyásol a *helper* plazmid jelenléte, addig a *xis* expressziójának megindulásához a *helper* AcaCD aktivátora szükséges. *Helper* plazmid hiányában a rekombináció iránya alapvetően az integráció irányába van eltolódva, hiszen Xis hiányában a rekombinációs komplex struktúrájának köszönhetően az integrációt tudja elsősorban végrehajtani. Az IncA/C plazmidok AcaCD mesterregulátorra képes megfordítani a rekombinációt a kivágódás irányába a *xis* expressziójának aktiválásán keresztül, mivel ez esetben a rekombinációs komplex felépítésében a Xis fehérje is részt vesz.

Összességében az SGI1 integrációja autonóm módon megy végbe, míg kivágódása *semi*-autonómnak tekinthető. Az *int/xis* rendszer egyrészt a sziget kromoszómára való integrációját végzi (vertikális transzferét biztosítja), másrészt a rendszer időzíteni tudja az SGI1 kivágódását a *helper* elem megjelenéséhez, amely a hatékony konjugáció (horizontális transzfer) előfeltétele. Ez a különböző IME-k terjedésének igen hatékony stratégiája lehet. Mivel az IME-k ICE-kkel ellentétben a horizontális transzferre nézve nem-autonóm elemek, ezért igen lényeges, hogy az IME mindaddig integrált formában tudjon maradni, míg a *helper* elem meg nem jelenik.

## 2. Az SGI1-IncA/C rendszer FlhDC-homológ mesterregulátorainak vizsgálata

Az FlhDC homológ AcaCD-t IncA/C plazmidokon az Acr1 és Acr2 represszorok szabályozzák (Carraro és mtsai, 2014a). Az IncA/C plazmidokon 18 promóterben azonosítottak AcaCD kötőhelyet, amelyek többek között a T4SS elemeit kódoló operonokat szabályozzák (Poulin-Laprade és mtsai, 2015a). A plazmid eredetű konszenzus szekvencia felhasználásával az SGI1-en öt AcaCD kötőhellyel rendelkező promótert prediktáltak (Carraro és mtsai, 2014a).

Megvizsgáltuk az AcaCD-nek az SGI1 és IncA/C plazmidok mobilizációjában betöltött szerepét. Kimutattuk, hogy AcaCD hiányában sem az SGI1, sem a *helper* plazmid nem képes a konjugatív transzferre, tehát az AcaCD mesterregulátor feltétlenül szükséges az SGI1 kivágódásához, azt követő transzferéhez, illetve az IncA/C plazmidok konjugációjához is (ld. IV/1.). Az *acaCD* deléción *transz*-komplementálhatónak bizonyult, az R16a plazmid konjugációs funkciói helyreálltak, illetve az SGI1 is mobilizálhatóvá vált AcaCD expresszió esetén (ld. IV/2.). Az AcaCD az SGI1-en a *xis* expressziójának növelésével indukálja a kivágódást, így az SGI1 immáron körre zárult formában ki tudja használni az R16a plazmid konjugációs apparátusát horizontális terjedéséhez. Megemlítendő, hogy az SGI1 transzfer frekvenciája a

wt R16a plazmid jelenlétében mért konjugációs frekvenciához képest egy nagyságrenddel alacsonyabb értékeket mutatott az AcaCD túltermeltetése mellett, ami azzal magyarázható, hogy a nagy mennyiségű AcaCD jelenléte az SGI1 erőteljesebb vesztődését okozhatja. Az R16a $\Delta$ acaCD plazmid konjugációjának teljes helyreállása magyarázható azzal, hogy az AcaCD elsősorban a konjugációs apparátus promótereit szabályozza a plazmidon és az AcaCD túltermeltetése nem befolyásolja negatívan az R16a plazmid stabilitását a baktériumban, amelyet stabilitási vizsgálatunk is megerősített.

Az SGI1-en is azonosítottunk egy FlhDC homológ mesterregulátort, amely közelebbi rokonságot mutat az IncA/C plazmidok AcaCD-jével (ld. IV/3.). Az *flhDC*<sub>SGI1</sub> esetén az Acr1-hez és Acr2-höz hasonló vagy az SXT-k SetR-jéhez hasonló regulátorokat azonban eddig nem azonosítottak, így jelenleg nem ismert, hogy az *flhDC*<sub>SGI1</sub>-et milyen szignálok szabályozzák. Az *flhDC*<sub>SGI1</sub> konstitutív promóterrel rendelkezik, amelynek aktivitása megközelítőleg a  $P_{int}$  harmada (Kiss és mtsai, 2015).

Vizsgálatainkkal igazoltuk, hogy az FlhDC<sub>SGI1</sub> és AcaCD mesterregulátorok funkciói hasonlóak és azonos kötőhelyeken fejtik ki hatásukat. A túlexpresszáltatott FlhDC<sub>SGI1</sub> az AcaCD-hez hasonlóan képes az SGI1 kivágódását indukálni a *xis* promóterének aktiválásán keresztül. Mindkét aktivátor túltermeltetése során azt tapasztaltuk, hogy az SGI1 gyorsan vesztődik, ami annak köszönhető, hogy az SGI1 kivágódott állapotban instabilabb (Kiss és mtsai, 2015). Az AcaCD túltermeltetése mellett az SGI1 vesztődése intenzívebb volt (ld. IV/8.2), melynek okait még vizsgáljuk.

Az FlhDC<sub>SGI1</sub> túltermeltetésével is lehetett komplementálni a *helper* plazmid *acaCD* delécióját, a plazmid konjugatív funkciói helyreálltak (ld. IV/4.). Az FlhDC<sub>SGI1</sub> expresszáltatása megközelítőleg 3-5-ször nagyobb gyakoriságú transzfert eredményezett mind az SGI1, mind az R16a plazmid esetében, mint az AcaCD expressziója. Ennek a megfigyelésnek a magyarázata az lehet, hogy a szelektíven növesztett donor törzsekben a genomi sziget és a *helper* a kétféle expressziós plazmid jelenlétében populációs szinten különböző arányban maradhatott együtt. Ha a „gyengébb” aktivátornak tekinthető FlhDC<sub>SGI1</sub> expressziója könnyebben együtt tud maradni az SGI1 és a *helper*, akkor a konjugációjuk is hatékonyabb lehet.

Az aktivátorok funkcióbeli hasonlóságát az SGI1-en prediktált AcaCD kötőhelyeket tartalmazó promóterek ( $P_{xis}$ ,  $P_{S004}$ ,  $P_{S005}$ ,  $P_{S012}$ ,  $P_{S018}$ ) aktivitás vizsgálatával is megerősítettük. Bebizonyítottuk, hogy az FlhDC<sub>SGI1</sub> ugyanazon promótereken hat, mint az AcaCD (ld. IV/5.).

Aktivátorok hiányában a promótereken nem, vagy csak kis mértékű transzkripciót lehetett kimutatni. Az aktivátorok jelenlétében mindegyik AcaCD kötőhellyel rendelkező promóternek jelentősen nőtt az aktivitása. Az AcaCD hatására általánosan 3-5× erősebb akti-

vációt mértünk, mint FlhDC<sub>SGII</sub> jelenlétében. Ez egyértelmű bizonyítéka annak, hogy az FlhDC<sub>SGII</sub> működésében hasonló az AcaCD-hez, bár hatása nem olyan erőteljes, mint a *helper* plazmid által kódolt mesterregulátoré.

Mivel kísérleti rendszerünkben az expressziós plazmidokról jelentősen több aktivátor termelődik, mint amikor az SGI1 többnyire egy kópiában a kromoszómába integráltan fordul elő, így ez magyarázhatja, hogy miért nem nyilvánul meg például az FlhDC<sub>SGII</sub> hatása a sziget kivágódásában, s így vesztődésében, amely kísérleti rendszereinkben viszonylag érzékenyen detektálható lenne. Feltehetőleg konstitutív expressziója nem olyan mértékű, ami elegendő lenne a kivágódás indukciójához, mivel más *flhDC*<sub>SGII</sub> expressziót szabályozó faktort nem azonosítottak eddig.

Az SGI1-en lévő AcaCD kötőhellyel rendelkező promótereket részletesebben is megvizsgáltuk (ld. IV/6.). A TSS térképezés azt mutatta, hogy a TSS-ek környezetében minden esetben 5-7 bp távolságra található egy TATAAT konszenzussal jellemezhető szekvencia. Ettől a -10 promóter boxként emlegetett szekvenciától az AcaCD kötőhelyek *upstream* 22-24 bp távolságban helyezkednek el, ami az IncA/C plazmidok AcaCD által szabályozott promótereire is jellemző (Carraro és mtsai, 2014a). Az egyes kötőhelyek szekvenciahasonlósága alapján elmondható, hogy a kötőhelyek egy központi konzervált motívummal rendelkeznek. Az AcaCD-reszponzív promóterekben nem találtunk a klasszikus -35 boxhoz (TTGACA) hasonló szekvenciát, melyekhez a bakteriális promóterekben a  $\sigma^{70}$  faktor kapcsolódik. Így elméletileg AcaCD aktiváció többféle módon is megvalósulhat, vagy helyettesíti a  $\sigma$  faktort az RNS polimerázban, vagy toborozza a RNS polimeráz  $\sigma^{70}$  alegységét, vagy esetleg más  $\sigma$  alegységeket is, melyeknek stresszválasz esetén lehet jelentősége. A flagelláris bioszintézisben résztvevő FlhDC mesterregulátorok esetén ez utóbbi hipotézist igazolták (Soutourina és mtsai, 1999).

A P<sub>S004</sub> esetén mind az FlhDC homológok jelenlétében végzett promóter aktivitás vizsgálatok, mind a TSS térképezés eredménye azt igazolta, hogy az S004 START helye nem az eredetileg annotált pozícióban van, hanem az ORF belsejében. A Boyd és mtsai által (Boyd és mtsai., 2000) annotált fehérjét (S004L) és az általunk prediktált rövidebb fehérjét (S004S) overexpresszáltuk és megvizsgáltuk hatásukat a baktérium növekedésére (ld. IV/7.). Az S004S fehérje kis mérete ellenére hasonló mértékben gátolta a baktériumok növekedését, mint egy négyszer akkora fehérje (RepA), ami arra utalhat, hogy valójában ennek a rövid S004S fehérjének vannak biológiai funkciói a sejtben.

Az S004S fehérje szekvenciájával keresést végeztünk a fehérje adatbázisokban, melynek eredményeképp valószínűsíthető, hogy az S004 tartalmaz egy HTH motívumot (36-99

aminosav régió), amely a MerR szabályozó fehérjék DNS-kötő motívumára hasonlít és rokonságot mutat az AlpA fág szabályozó fehérjékkel is (azonosság: 38-42%, hasonlóság: 59-64%). Bár a HTH motívum megtalálható a hosszabb és a rövidebb S004 polipeptidben is, az expresszálo törzsek növekedési görbéje arra utal, hogy a rövidebb verziónak jelentősebb biológiai hatásai lehetnek. Mivel az S004L transzkriptumot sem tudtuk detektálni, így nem valószínű, hogy előfordulna a hosszabb fehérje a sejtben.

Összességében elmondható, hogy az FlhDC homológ mesterregulátorok túltermeltetése mellett az SGI1 szegregációjának vizsgálata, a promóter aktivitás vizsgálatok és a komplementációs tesztek mind alátámasztják, hogy az FlhDC<sub>SGI1</sub> és az AcaCD hatóhelyei azonosak, hasonló szabályozó funkciókat látnak el, de az FlhDC<sub>SGI1</sub> aktivitása kisebb. Azt, hogy az FlhDC<sub>SGI1</sub> gyengébb aktivátor, az is alátámasztja, hogy az SGI1 kivágódását natív állapotban nem lehet detektálni. Valószínűleg az *flhDC*<sub>SGI1</sub> konstitutív expressziója nem olyan mértékű, hogy az FlhDC<sub>SGI1</sub> által indukált *xis* expressziója elegendő lenne a sziget kivágódáshoz. Megjegyzendő, hogy az *flhDC*<sub>SGI1</sub> alapaktivitása más operonok szabályozásához elégséges lehet (pl. *traHG* operon), erről bővebben ld. a Diskusszió 3. fejezetét.

### 3. Az SGI1 és IncA/C plazmidok inkompatibilitásának vizsgálata

Az SGI1 és IncA/C plazmidok között tapasztalható kölcsönös destabilizáló hatást, melyet egyfajta inkompatibilitásként foghatunk fel, több aspektusból is vizsgáltuk.

A plazmidok inkompatibilitása legtöbbször replikációs vagy Par rendszereik interferálódásából ered (Humbert és mtsai, 2019), de érdemes megjegyezni, hogy az egyes mobilis elemek stabilitását a TA rendszerek is segíthetik.

Az R55 plazmid SGI1-re gyakorolt destabilizáló hatása az AcaCD indukált kivágódás következménye (Kiss és mtsai, 2015). Az SGI1 kivágódott formájának stabilabb fennmaradását a populációban bizonyos mértékben az SgiAT (S025-S026) rendszer segíti (Huguet és mtsai, 2016), de önmagában a TA rendszer megléte vagy hiánya nem hozható összefüggésbe a két elem inkompatibilitásával.

Harmer és mtsai az IncC plazmidok destabilizációját vizsgálták SGI1 jelenlétében. Megfigyelésük alapján egyetlen SGI1 variáns (SGI1-K) mellett maradt stabil a *helper*. Az SGI1-K variánssal kapcsolatban tapasztalt eredményük alapján arra a megállapításra jutottak, hogy az *flhDC*<sub>SGI1</sub>-nek szerepe lehet az IncC plazmidok destabilizációjában, mivel az SGI1-K variánsban létrejött nagyméretű delécia kiejtette a regulátor operonját is (Harmer és mtsai, 2016).

Az SGI1-re való antibiotikus szelekció mellett  $\Delta flhDC_{SGI1}$  mutánsal ennek ellentmondó eredményt kaptunk. Az R55 plazmid a mutáns mellől wt SGI1-hez hasonló mértékben szegregált, így a  $\Delta flhDC_{SGI1}$  mutánst antibiotikus szelekció hiányában is megvizsgáltuk (ld. IV/8.1 és 8.2). Azt tapasztaltuk, hogy az IncA/C és SGI1 elemek megoszlása a populációban eltérő volt a mutáns és a wt. SGI1 jelenlétében. A mutáns mellett az R55 plazmid nagyobb mértékben fennmaradt, de semmiképp nem stabilizálódott. Azt mondhatjuk, hogy a vesztődés dinamikája változott meg. Az SGI1 vesztődését nem befolyásolta az FlhDC<sub>SGI1</sub> megléte vagy hiánya. Megfigyeltük továbbá, hogy a *helper* plazmid nagyobb gyakorisággal jut át a mutáns törzsbe, mint wt SGI1 mellé, ami esetleg arra enged következtetni, hogy az FlhDC<sub>SGI1</sub> az SGI1-ben olyan faktorokat indukál, amelyek a *helper* bejutását akadályozhatják. Bár ez a sziget horizontális terjedését gátolná, ami nem biztos, hogy evolúciós szempontból nyertes stratégia. Sokkal inkább valószínűsíthető, hogy a bejutást követő inkompatibilitásból adódik, hogy eltérő a két törzsben a transzfer gyakoriság. Ezt fentebb vázolt kísérleti eredmények is alátámaszthatják, hiszen a wt SGI1 mellől gyorsabban veszett a *helper*. Az aktivátor overexpresszáltatásakor 100 generációt követően sem tudtuk detektálni a *helper* plazmid szegregációját, tehát az aktivátor önmagában nem okozója a *helper* destabilizációjának.

Megemlítendő, hogy az FlhDC a *traHG* operont is szabályozhatja SGI1-en a P<sub>S012</sub> promóteren keresztül. Carraro és mtsai korábban elemezték az IncC plazmidok Eex (*entry exclusion*) rendszerét és az SGI1-gyel kapcsolatban arra a megállapításra jutottak, hogy az SGI1 az általa kódolt TraG (S011) fehérje segítségével képes az Eex rendszert megkerülni, azaz egy *helper* plazmidot hordozó sejtbe nagyobb gyakorisággal képes bejutni (Carraro és mtsai, 2017a). Eredményeink az Eex jelenségével összefüggésbe is hozhatók. Lehetséges, hogy az FlhDC<sub>SGI1</sub> közvetve a *traG* szabályozásán keresztül akadályozza a *helper* plazmid bejutását a sejtbe annak Eex rendszerét kihasználva. Az SGI1-ről expresszáldó FlhDC<sub>SGI1</sub> mennyisége a kivágódás aktiválásához ugyan nem elégséges, azonban lehetséges, hogy a *traHG* (S012-S011) operon alapszintű expressziójához elegendő. Ez esetben elképzelhető, hogy az IncC plazmidok Eex rendszerét kihasználva kis mértékben képes gátolni az IncC plazmidok transzferét az SGI1-et hordozó baktériumsejtbe, ami az integrált IME számára stabilitási szempontból előnyös lehet, de horizontális terjedésének viszont nem kedvez. A hipotézis bizonyításához meg kell ismerni a TraG fehérje pontos funkcióját az Eex rendszerben, melyhez további vizsgálatok szükségesek.

Az SGI1 $\Delta flhDC_{SGI1}$  mutáns vizsgálatával kapott eredmények arra utalnak, hogy az aktivátornak szerepe lehet a *helper* destabilizálásában, de hatását nem közvetlenül fejt ki, hiszen az overexpresszált FlhDC<sub>SGI1</sub> az AcaCD-hez hasonlóan nem indukálta az R55 plazmid

szegregációját. Vizsgálatainkból azonban az is egyértelműen kiderült, hogy önmagában az *flhDC*<sub>SGII</sub> deléciója nem elegendő magyarázat az SGI1 és az IncC plazmidok között fennálló összeférhetetlenségre. Az SGI1 $\Delta$ *flhDC*<sub>SGII</sub> mutáns mellett nem stabilizálódott a *helper*, csupán a plazmid vesztés dinamikája csökkent, amíg az SGI1 $\Delta$ S013-S018 mutáns mellett az R55 *helper* 100 generációt követően is stabil maradt. Így alapos okunk volt feltételezni, hogy az SGI1-en egyéb faktorok is találhatók, melyek tovább erősítik a két MGE közötti inkompatibilitást. Az inkompatibilitással gyanúsítható faktor(oka)t olyan plazmidon kerestük (pJKI670), mely már nem hordozta sem az Eex rendszerrel kapcsolatba hozható *traG*-t, sem az *flhDC*<sub>SGII</sub>-et, sem az SGI1 cirkuláris formájának stabilitását elősegítő SgiAT rendszert, ennek ellenére jelenlétében az R55 gyors szegregációját figyeltük meg. Ez a plazmid még tartalmazta az *int/xis* rendszert, illetve az SGI1 replikációs régióját is, amelyeknek direkt szerepét az inkompatibilitás kialakításában később kizártuk.

Deléciós analízissel és irányított mutációkkal sikerült kimutatnunk, hogy az S013 ORF *upstream* régiójában található 31 bp hosszú DR szekvencia tehető felelőssé az inkompatibilitásért, amely az S004 ORF *upstream* régiójában is megtalálható, ebből adódik neve is. A DR mutagenézise az R55 plazmid stabilitását eredményezte, ami azt bizonyította, hogy ez a rövid szekvencia feltétlenül szükséges az inkompatibilitás kialakításához. A DR egyik fele szimmetrikus felépítésű, 11 bp hosszú inverz *repeat* (IR) régiót tartalmaz, melynek *core* része (TTTCACATGTGAAA) több kópiában megtalálható az IncA/C plazmid konzervált gerincén is. Többek között a *parAB* operon promóter régiójában is megtalálható, amely az IncA/C plazmidok Par funkcióit kódolja. Emellett ez a szekvencia feltűnően hasonlít a kromoszóma szegregációs rendszerek (ParABS) *parS* helyeinek konszenzus szekvenciájához is (TTTCACGTGAAA), amelyek megtalálhatók különféle baktériumfajokban (pl. *Myxococcus xanthus*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*) (Yamaichi és Niki, 2000; Iniesta, 2014; Kawalek és mtsai, 2020).

A Par rendszerek *cis*-elemeit ritkán azonosítják, általánosan elmondható, hogy ezek a rövid centromer jellegű *cis*-ható helyek rendkívül változatosak. Ennek megfelelően az IncA/C plazmidok Par rendszereinek *parC* és *srpC* helyeit sem azonosították még (Baxter és Funnell, 2014; Carraro és mtsai, 2015b; Hancock és mtsai, 2016). Rendszerint a *parC* helyekhez kötődik a ParB fehérje, amelynek kölcsönható partnere általában egy Walker-típusú ParA fehérje (Baxter és Funnell, 2014).

A Par rendszerek közül az IncA/C plazmidok nem csupán a ParABC rendszert kódolják, hanem egy ParMRC-szerű SrpMRC rendszert is, ezeket azonban kísérletesen még nem vizsgálták (Carraro és mtsai, 2015b; Hancock és mtsai, 2016).

Az IncA/C ParABC rendszerét szabályozó faktorokat még nem azonosítottak, az operon *upstream* régiójában található *parS*-szerű IR szekvencia alapján feltételezhető, hogy az operon autoregulációját a ParB fehérje végzi, amely ParB doménje mellett egy KorB domént is hordoz (Hancock és mtsai, 2016). A KorB fehérjék általában transzkripciós represszorok és saját operonjukat is szabályozzák (Jagura-Burdzy és mtsai, 1999). Mindezek alapján elképzelhető, hogy az SGI1 kihasználja a *helper* ParABC rendszerét, amennyiben az inkompatibilitás kapcsán azonosított DR szekvencia a *helper* ParB kötőhelyeként szolgál. Szekvencia hasonlóságok alapján ez egy könnyen elképzelhető hipotézis, amelyhez további vizsgálatok szükségesek.

A Par rendszer(ek) kihasználásával a kivágódott és körre záródott SGI1 egyrészt saját vertikális terjedését biztosíthatja, másrészt ennek járulékos eredménye lehet a két mobilis elem közötti inkompatibilitás kialakulása, azaz az IncA/C plazmid vesztődése, amennyiben a kivágódott és körre zárt SGI1 kópiaszáma magasabb a *helper* kópiaszámánál. Ez utóbbi feltevést kutatócsoportunk már igazolta (Szabó és mtsai, előkészületben).

Érdekesség, hogy az SrpMRC rendszer az AcaCD szabályozása alatt áll (Carraro és mtsai, 2015b), ami felveti a kérdést, hogy az SGI1 által kódolt FlhDC<sub>SGI1</sub> aktivátor befolyásolhatja-e az IncA/C Par funkcióit. Mivel az SGI1  $\Delta flhDC_{SGI1}$  mutáns mellett az R55 vesztődésének dinamikája csökken, így elképzelhető, hogy a wt SGI1 jelenlétében az FlhDC<sub>SGI1</sub> és az AcaCD kompetíciója révén kevésbé aktiválható az SrpMRC rendszer, ami végső soron az IncA/C plazmid vesztődéséhez vezethet. Ez elsősorban az FlhDC kevésbé jó aktivátor hatásával indokolható. Ez az SGI1 szempontjából nézve egy hatékony stratégia lehet a *helper* elem eltávolításához, azaz az inkompatibilitás kialakításához.

Továbbá kimutattuk, hogy a DR elem inkompatibilitásban betöltött szerepe kizárólag az S014-S015 ORF-ok között elhelyezkedő NCR jelenlétében detektálható. A ható faktort tartalmazó DNS szekvenciát 358 bp-ra sikerült lerövidítenünk. Mivel a régióban nem találunk aktív transzkripcióra utaló nyomokat, ezért feltehetőleg ez esetben is *cis* szabályozó elemről beszélhetünk, de ennek felderítése még folyamatban van. Vizsgálataink alapján úgy gondoljuk, hogy NCR és DR faktorok hatása funkcionálisan kapcsolt, hiszen ha bármelyik hiányzik a rendszerünkből, akkor az R55 stabillá válik.

A DR és NCR faktorok között elhelyezkedő operon által kódolt fehérjék (S013 és S014) kisebb-nagyobb mértékben, de részt vehetnek az inkompatibilitást kialakító folyamatban. A fehérjék elrontásával az R55 kisebb mértékben stabilizálódni látszott. A DR szekvencia elhelyezkedése és az operon szerveződése miatt ez akár egy aktív Par rendszer vagy annak maradványa lehet. A fehérjeszekvenciák összehasonlítása alapján azonban sem az S013, sem



az S014 fehérjék nem mutatnak hasonlóságot a ParA vagy ParB fehérjékkel. Szerepük tisztázásához további vizsgálatokra lesz szükség.

Mindent összevetve az SGI1 egy szerteágazó molekuláris kapcsolatrendszert alakított ki az IncA/C *helper* plazmidokkal, ami arra is utalhat, hogy a két eltérő stratégiát követő MGE közös ősből származtatható. Az SGI1 horizontális transzfere a *helper* elem jelenlétén múlik, kivágódásához a plazmid mesteraktivátorát, konjugációjához a plazmid transzfer apparátusát használja. Vizsgálataink alapján feltételezhető, hogy az SGI1 a *helper* elem Par rendszerének kihasználásával és/vagy megzavarásával biztosítja saját fennmaradását a sejtosztódások során a populációban. A Par rendszerrel való interferálódás megértéséhez, a mechanizmus pontos működésének feltárásához és a folyamatban résztvevő további faktorok azonosításához még további kutatásra lesz szükség.

## VI. Összefoglalás

A mobilis genomi szigetek világában vannak olyan elemek, amelyek autonóm módon képesek integrálódni/kivágódni és konjugáció útján terjedni. Az elmúlt évtizedekben egyre több mobilizálható genetikai elemet azonosítottak, amelyek horizontális transzferéhez egy konjugatív *helper* elem jelenlétére van szükség. A Salmonella Genomic Island 1 egy olyan integratív mobilizálható elem, amelynek konjugatív transzferéhez egy IncA/C csoportba tartozó *helper* plazmidra van szükség. Tanulmányom célja a két mobilis genetikai elem komplex molekuláris interakcióinak felderítése volt.

Bizonyítottuk, hogy a SGI1 kivágódásának alapfeltétele a *helper* által termelt AcaCD aktivátor kötőhelyének megléte az SGI1 *xis* génjének promóter régiójában. Kiderítettük, hogy az AcaCD kötőhellyel rendelkező promótereket nem csupán az AcaCD képes pozitívan szabályozni, hanem egy SGI1 által kódolt homológ, az FlhDC<sub>SGI1</sub> is, mely az AcaCD-vel azonos kötőhelyeken hat. Az FlhDC<sub>SGI1</sub> aktivitása az összes AcaCD-reszponzív SGI1 promóteren hozzávetőleg háromszor gyengébbnek bizonyult az AcaCD aktivitásánál, de túltermeltetésével indukálni lehet a SGI1 kivágódását és a *helper* plazmid *acaCD* deléciója is komplementálható volt. Azonosítottuk az AcaCD/FlhDC<sub>SGI1</sub> által szabályozott S004, S005 (*traN*), S012 (*traH*) és S018 gének transzkripció starthelyeit és igazoltuk, hogy az annotált S004-ről valójában egy rövidebb fehérje transzlálódik, melynek túltermeltetése gátolja a baktérium növekedését.

Az SGI1 és IncA/C plazmidok együttes fennmaradásának analízise alapján az SGI1-en eddig ismert stabilitást befolyásoló TA rendszer mellett azonosítottunk két olyan faktort, amelyek megléte az IncA/C plazmidok szegregációját okozza. A két faktor közül az egyik összefüggésbe hozható az IncA/C plazmidok ParABC rendszerével, bár a megfigyelt jelenség mechanizmusának pontos felderítéséhez még további kutatásokra lesz szükség. A két elem között elhelyezkedő operon által kódolt fehérjék szintén részt vehetnek ebben a mechanizmusban, de annak nem esszenciális elemei.

Az SGI1 tehát különböző stratégiákat használ stabil fennmaradásához. Vertikális transzferéhez akadályozza a *helper* elem belépését és fennmaradását, míg kromoszómáról való kivágódását és horizontális terjedését a *helper* plazmid megjelenéséhez időzíti, kihasználja annak konjugatív transzfer apparátusát, és esetlegesen Par rendszereit is.

## VII. Summary

In the world of the mobile genomic islands, there are elements, which can autonomously integrate/excise and conjugate into recipient cells. In recent decades, an increasing number of mobilizable genetic elements have been identified, which need the presence of a conjugative helper element for their horizontal transfer. The Salmonella Genomic Island 1 is an integrative mobilizable element, which needs a helper plasmid belonging to the IncA/C group for its conjugative transfer. The aim of my study was to explore the complex molecular interactions of these two mobile genetic elements.

We have proven that the presence of the helper-produced AcaCD activator's binding site in the *xis* promoter region is an essential criterion for the excision of SGI1. We found that promoters containing AcaCD binding sites can be regulated positively not only by AcaCD, but also by the FlhDC<sub>SGI1</sub> homolog encoded by SGI1, which act on the same AcaCD binding sites. The activities of FlhDC<sub>SGI1</sub> on AcaCD-responsive promoters are approximately three-fold weaker than that of AcaCD, although the overexpression of FlhDC<sub>SGI1</sub> can induce SGI1 excision and complement *acaCD* deletion of IncC plasmids. We have determined the transcription start sites of the AcaCD binding site containing promoters of S004, S005 (*traN*), S012 (*traH*) and S018 and proved that there is a shorter protein actually, which is translated from the originally annotated S004 and its overexpression has a negative effect on bacterial growth.

Based on the cohabitation analysis of SGI1 and IncA/C plasmids, in addition to stability-affecting TA system, which is known so far, two *cis*-acting elements that cause segregation of IncA/C plasmids have been identified. One of the two *cis*-elements may be related to the ParABC system of the IncA/C plasmids, although further research will be needed to elucidate the mechanism of the observed phenomenon. The S013 and S014 encoded by SGI1, which are located between the two *cis*-elements, are also active but not essential elements of this mechanism.

In summary, SGI1 uses different strategies for its stable survival. It prevents the entry and maintenance of the helper element for its stable vertical transmission, while the timing of excision is linked to the appearance of the helper element and it utilizes the conjugative transfer system, and perhaps the Par systems of the helper.

## VIII. Irodalomjegyzék

- Ambrose, S. J., Harmer, C. J., és Hall, R. M. (2018). Compatibility and entry exclusion of IncA and IncC plasmids revisited: IncA and IncC plasmids are compatible. *Plasmid* 96–97, 7–12. doi:10.1016/j.plasmid.2018.02.002.
- Audette, G. F., Manchak, J., Beatty, P., Klimke, W. A., és Frost, L. S. (2007). Entry exclusion in F-like plasmids requires intact TraG in the donor that recognizes its cognate TraS in the recipient. *Microbiology* 153, 442–451. doi:10.1099/mic.0.2006/001917-0.
- Babakhani, S., és Oloomi, M. (2018). Transposons: the agents of antibiotic resistance in bacteria. *J. Basic Microbiol.* 58, 905–917. doi:10.1002/jobm.201800204.
- Bañuelos-Vazquez, L. A., Torres Tejerizo, G., és Brom, S. (2017). Regulation of conjugative transfer of plasmids and integrative conjugative elements. *Plasmid* 91, 82–89. doi:10.1016/j.plasmid.2017.04.002.
- Baxter, J. C., és Funnell, B. E. (2014). Plasmid Partition Mechanisms. *Microbiol. Spectr.* 2. doi:10.1128/microbiolspec.PLAS-0023-2014.
- Beaber, J. W., Hochhut, B., és Waldor, M. K. (2004). SOS response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes. *Nature* 427, 72–74. doi:10.1038/nature02241.
- Bellanger, X., Payot, S., Leblond-Bourget, N., és Guédon, G. (2014). Conjugative and mobilizable genomic islands in bacteria: evolution and diversity. *FEMS Microbiol. Rev.* 38, 720–760. doi:10.1111/1574-6976.12058.
- Bignell, C., és Thomas, C. M. (2001). The bacterial ParA-ParB partitioning proteins. *J. Biotechnol.* 91, 1–34. doi:10.1016/S0168-1656(01)00293-0.
- Bolland, S., Llosa, M., Avila, P., és de la Cruz, F. (1990). General organization of the conjugal transfer genes of the IncW plasmid R388 and interactions between R388 and IncN and IncP plasmids. *J. Bacteriol.* 172, 5795–5802. doi:10.1128/JB.172.10.5795-5802.1990.
- Boyd, D., Peters, G., Ng, L. K., és Mulvey, M. R. (2000). Partial characterization of a genomic island associated with the multidrug resistance region of *Salmonella enterica* Typhimurium DT104. *FEMS Microbiol. Lett.* 189, 285–291. doi:10.1016/S0378-1097(00)00264-0.
- Boyd, D., Peters, G. A., Cloeckert, A., Boumedine, K. S., Chaslus-Dancla, E., Imberechts, H., és Mulvey M. R. (2001). Complete nucleotide sequence of a 43-kilobase genomic island associated with the multidrug resistance region of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 and its identification in phage type DT120 and serovar Agona. *J. Bacteriol.* 183, 5725–32. doi:10.1128/JB.183.19.5725-5732.2001.
- Brooks, A. C., és Hwang, L. C. (2017). Reconstitutions of plasmid partition systems and their mechanisms. *Plasmid* 91, 37–41. doi:10.1016/j.plasmid.2017.03.004.
- Burrus, V., Pavlovic, G., Decaris, B., és Guédon, G. (2002). The ICeSt1 element of *Streptococcus thermophilus* belongs to a large family of integrative and conjugative elements that exchange modules and change their specificity of integration. *Plasmid* 48, 77–97. doi:10.1016/S0147-619X(02)00102-6.
- Burrus, V., és Waldor, M. K. (2003). Control of SXT Integration and Excision. *J. Bacteriol.* 185, 5045–5054. doi:10.1128/JB.185.17.5045-5054.2003.
- Burrus, V., és Waldor, M. K. (2004). Shaping bacterial genomes with integrative and conjugative elements. *Res. Microbiol.* 155, 376–86. doi:10.1016/j.resmic.2004.01.012.
- Campbell, A. (2003). The future of bacteriophage biology. *Nat. Rev. Genet.* 4, 471–477. doi:10.1038/nrg1089.
- Carraro, N., és Burrus, V. (2015). The dualistic nature of integrative and conjugative

- elements. *Mob. Genet. Elements* 5, 98–102. doi:10.1371/journal.pgen.1005298.
- Carraro, N., Durand, R., Rivard, N., Anquetil, C., Barrette, C., Humbert, M., és Burrus, V. (2017a). Salmonella genomic island 1 (SGI1) reshapes the mating apparatus of IncC conjugative plasmids to promote self-propagation. *PLoS Genet.* 13, 1–20. doi:10.1371/journal.pgen.1006705.
- Carraro, N., Matteau, D., Burrus, V., és Rodrigue, S. (2015a). Unraveling the regulatory network of IncA/C plasmid mobilization: When genomic islands hijack conjugative elements. *Mob. Genet. Elements* 5, 34–38. doi:10.1080/2159256X.2015.1045116.
- Carraro, N., Matteau, D., Luo, P., Rodrigue, S., és Burrus, V. (2014a). The Master Activator of IncA/C Conjugative Plasmids Stimulates Genomic Islands and Multidrug Resistance Dissemination. *PLoS Genet.* 10. doi:10.1371/journal.pgen.1004714.
- Carraro, N., Poulin, D., és Burrus, V. (2015b). Replication and Active Partition of Integrative and Conjugative Elements (ICEs) of the SXT/R391 Family: The Line between ICEs and Conjugative Plasmids Is Getting Thinner. *PLOS Genet.* 11, e1005298. doi:10.1371/journal.pgen.1005298.
- Carraro, N., Rivard, N., Burrus, V., és Ceccarelli, D. (2017b). Mobilizable genomic islands, different strategies for the dissemination of multidrug resistance and other adaptive traits. *Mob. Genet. Elements* 7, 1–6. doi:10.1080/2159256X.2017.1304193.
- Carraro, N., Rivard, N., Ceccarelli, D., Colwell, R. R., és Burrus, V. (2016). IncA/C Conjugative Plasmids Mobilize a New Family of Multidrug Resistance Islands in Clinical *Vibrio cholerae* Non-O1/Non-O139 Isolates from Haiti. *MBio* 7. doi:10.1128/mBio.00509-16.
- Carraro, N., Sauvé, M., Matteau, D., Lauzon, G., Rodrigue, S., és Burrus, V. (2014b). Development of pVCR94ΔX from *Vibrio cholerae*, a prototype for studying multidrug resistant IncA/C conjugative plasmids. *Front. Microbiol.* 5, 1–13. doi:10.3389/fmicb.2014.00044.
- Cherepanov, P. P., és Wackernagel, W. (1995). Gene disruption in *Escherichia coli*: TcR and KmR cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene* 158, 9–14. doi:10.1016/0378-1119(95)00193-a.
- Christie, P. J. (2016). The Mosaic Type IV Secretion Systems. *EcoSal Plus* 7. doi:10.1128/ecosalplus.ESP-0020-2015.
- Claret, L., és Hughes, C. (2000). Functions of the subunits in the FlhD 2 C 2 transcriptional master regulator of bacterial flagellum biogenesis and swarming 1 Edited by I. B. Holland. *J. Mol. Biol.* 303, 467–478. doi:10.1006/jmbi.2000.4149.
- Cloekaert, A., és Schwarz, S. (2001). Molecular characterization, spread and evolution of multidrug resistance in *Salmonella enterica* Typhimurium DT104. *Vet. Res.* 32, 301–310. doi:10.1051/vetres:2001126.
- Cummins, M. L., Hamidian, M., és Djordjevic, S. P. (2020). Salmonella Genomic Island 1 is Broadly Disseminated within Gammaproteobacteriaceae. *Microorganisms* 8, 161. doi:10.3390/microorganisms8020161.
- Cummins, M. L., Roy Chowdhury, P., Marena, M. S., Browning, G. F., és Djordjevic, S. P. (2019). Salmonella Genomic Island 1B Variant Found in a Sequence Type 117 Avian Pathogenic *Escherichia coli* Isolate. *mSphere* 4. doi:10.1128/mSphere.00169-19.
- Daccord, A., Ceccarelli, D., és Burrus, V. (2010). Integrating conjugative elements of the SXT/R391 family trigger the excision and drive the mobilization of a new class of *Vibrio* genomic islands. *Mol. Microbiol.* 78, 576–588. doi:10.1111/j.1365-2958.2010.07364.x.
- Daccord, A., Ceccarelli, D., Rodrigue, S., és Burrus, V. (2013). Comparative analysis of mobilizable Genomic Islands. *J. Bacteriol.* 195, 606–614. doi:10.1128/JB.01985-12.
- Datsenko, K. A., és Wanner, B. L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 6640–5.

- doi:10.1073/pnas.120163297.
- Datta, N., és Hedges, R. W. (1973). R Factors of Compatibility Group A. *J. Gen. Microbiol.* 74, 335–336. doi:10.1099/00221287-74-2-335.
- de Curraize, C., Siebor, E., Neuwirth, C., és Hall, R. M. (2020). SGI0, a relative of Salmonella genomic islands SGI1 and SGI2, lacking a class 1 integron, found in *Proteus mirabilis*. *Plasmid* 107, 102453. doi:10.1016/j.plasmid.2019.102453.
- del Solar, G., Giraldo, R., Ruiz-Echevarría, M. J., Espinosa, M., és Díaz-Orejas, R. (1998). Replication and control of circular bacterial plasmids. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 434–64. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9618448>.
- Delavat, F., Miyazaki, R., Carraro, N., Pradervand, N., és van der Meer, J. R. (2017). The hidden life of integrative and conjugative elements. *FEMS Microbiol. Rev.* 41, 512–537. doi:10.1093/femsre/fux008.
- Deng, Y., Bao, X., Ji, L., Chen, L., Liu, J., Miao, J., Chen, D., Bian, H., Li, Y., és Yu, G. (2015). Resistance integrons: class 1, 2 and 3 integrons. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 14, 45. doi:10.1186/s12941-015-0100-6.
- Djordjevic, S. P., Cain, A. K., Evershed, N. J., Falconer, L., Levings, R. S., Lightfoot, D., és Hall, R. M. (2009). Emergence and evolution of multiply antibiotic-resistant *Salmonella enterica* serovar paratyphi B D-tartrate-utilizing strains containing SGI1. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 2319–2326. doi:10.1128/AAC.01532-08.
- Dobrindt, U., Hochhut, B., Hentschel, U., és Hacker, J. (2004). Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 414–424. doi:10.1038/nrmicro884.
- Domingues, S., da Silva, G. J., és Nielsen, K. M. (2012). Integrons. *Mob. Genet. Elements* 2, 211–223. doi:10.4161/mge.22967.
- Dorman, C. J., és Bogue, M. M. (2016). The Interplay between DNA Topology and Accessory Factors in Site-Specific Recombination in Bacteria and their Bacteriophages. *Sci. Prog.* 99, 420–437. doi:10.3184/003685016X14811202974921.
- Douard, G., Praud, K., Cloeckaert, A., és Doublet, B. (2010). The Salmonella Genomic Island 1 Is Specifically Mobilized In Trans by the IncA/C Multidrug Resistance Plasmid Family. *PLoS One* 5, e15302. doi:10.1371/journal.pone.0015302.
- Doublet, B., Boyd, D., Douard, G., Praud, K., Cloeckaert, A., és Mulvey, M. R. (2012). Complete nucleotide sequence of the multidrug resistance IncA/C plasmid pR55 from *Klebsiella pneumoniae* isolated in 1969. *J. Antimicrob. Chemother.* 67, 2354–2360. doi:10.1093/jac/dks251.
- Doublet, B., Boyd, D., Mulvey, M. R., és Cloeckaert, A. (2005). The Salmonella genomic island 1 is an integrative mobilizable element. *Mol. Microbiol.* 55, 1911–1924. doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04520.x.
- Doublet, B., Golding, G. R., Mulvey, M. R., és Cloeckaert, A. (2008a). Secondary Chromosomal Attachment Site and Tandem Integration of the Mobilizable Salmonella Genomic Island 1. *PLoS One* 3, e2060. doi:10.1371/journal.pone.0002060.
- Doublet, B., Lailler, R., Meunier, D., Brisabois, A., Boyd, D., Mulvey, M. R., Chaslus-Dancla, E., és Cloeckaert, A. (2003). Variant Salmonella Genomic Island 1 Antibiotic Resistance Gene Cluster in *Salmonella enterica* Serovar Albany. *Emerg. Infect. Dis.* 9, 585–591. doi:10.3201/eid0905.020609.
- Doublet, B., Praud, K., Bertrand, S., Collard, J. M., Weill, F. X., és Cloeckaert, A. (2008b). Novel insertion sequence- and transposon-mediated genetic rearrangements in genomic island SGI1 of *Salmonella enterica* serovar Kentucky. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52, 3745–3754. doi:10.1128/AAC.00525-08.
- Doublet, B., Weill, F., Fabre, L., Chaslus-Dancla, E., és Cloeckaert, A. (2004). Variant Salmonella Genomic Island 1 Antibiotic Resistance Gene Cluster Containing a Novel 3'

- N -Aminoglycoside Acetyltransferase Gene Cassette , aac ( 3 ) - Id , in *Salmonella enterica* Serovar Newport Variant *Salmonella* Genomic Island 1 Antibiotic Resi. 48, 3806–3812. doi:10.1128/AAC.48.10.3806.
- Ebner, P. (2004). Class 1 integrons in various *Salmonella enterica* serovars isolated from animals and identification of genomic island SGI1 in *Salmonella enterica* var. Meleagridis. *J. Antimicrob. Chemother.* 53, 1004–1009. doi:10.1093/jac/dkh192.
- Fernández-Alarcón, C., Singer, R. S., és Johnson, T. J. (2011). Comparative genomics of multidrug resistance-encoding *incA/C* plasmids from commensal and pathogenic *Escherichia coli* from multiple animal sources. *PLoS One* 6. doi:10.1371/journal.pone.0023415.
- Fillol-Salom, A., Alsaadi, A., Sousa, J. A. M. de, Zhong, L., Foster, K. R., Rocha, E. P. C., Penades, J. R., Ingmer, H., Haaber, J. (2019). Bacteriophages benefit from generalized transduction. *PLOS Pathog.* 15, e1007888. doi:10.1371/journal.ppat.1007888.
- Fitzgerald, D. M., Bonocora, R. P., és Wade, J. T. (2014). Comprehensive Mapping of the *Escherichia coli* Flagellar Regulatory Network. *PLoS Genet.* 10, e1004649. doi:10.1371/journal.pgen.1004649.
- Folster, J. P., Katz, L., McCullough, A., Parsons, M. B., Knipe, K., Sammons, S. A., Boncy, J., Tarr, C. L., és Whichard, J. M. (2014). Multidrug-Resistant *IncA/C* Plasmid in *Vibrio cholerae* from Haiti. *Emerg. Infect. Dis.* 20, 1951–1953. doi:10.3201/eid2011.140889.
- Fricke, W. F., Welch, T. J., McDermott, P. F., Mammel, M. K., LeClerc, J. E., White, D. G., Cebula, T. A., és Ravel, J. (2009). Comparative Genomics of the *IncA/C* Multidrug Resistance Plasmid Family. *J. Bacteriol.* 191, 4750–4757. doi:10.1128/JB.00189-09.
- Fronzes, R., Christie, P. J., és Waksman, G. (2009). The structural biology of type IV secretion systems. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 703–714. doi:10.1038/nrmicro2218.
- Frost, L. S., Leplae, R., Summers, A. O., és Toussaint, A. (2005). Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 722–732. doi:10.1038/nrmicro1235.
- Garcillán-Barcia, M. P., Francia, M. V., és de La Cruz, F. (2009). The diversity of conjugative relaxases and its application in plasmid classification. *FEMS Microbiol. Rev.* 33, 657–687. doi:10.1111/j.1574-6976.2009.00168.x.
- Gerdes, K., Møller-Jensen, J., és Jensen, R. B. (2002). Plasmid and chromosome partitioning: surprises from phylogeny. *Mol. Microbiol.* 37, 455–466. doi:10.1046/j.1365-2958.2000.01975.x.
- Gibson, T. J. (1984). Studies on the Epstein-Barr virus genome. Thesis.
- Gillings, M. R. (2014). Integrons: Past, Present, and Future. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 78, 257–277. doi:10.1128/MMBR.00056-13.
- Glynn, M. K., Bopp, C., Dewitt, W., Dabney, P., Mokhtar, M., és Angulo, F. J. (1998). Emergence of Multidrug-Resistant *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium DT104 Infections in the United States. *N. Engl. J. Med.* 338, 1333–1339. doi:10.1056/NEJM199805073381901.
- Golding, G. R., Olson, A. B., Doublet, B., Cloeckert, A., Christianson, S., Graham, M. R., és Mulvey, M. R. (2007). The effect of the *Salmonella* genomic island 1 on in vitro global gene expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Microbes Infect.* 9, 21–27. doi:10.1016/j.micinf.2006.10.004.
- Gonzy-Treboul, G., Karmazyn-Campelli, C., és Stragier, P. (1992). Developmental regulation of transcription of the *Bacillus subtilis* *ftsAZ* operon. *J. Mol. Biol.* 224, 967–979. doi:10.1016/0022-2836(92)90463-T.
- Groth, A. C., és Calos, M. P. (2004). Phage Integrases: Biology and Applications. *J. Mol. Biol.* 335, 667–678. doi:10.1016/j.jmb.2003.09.082.
- Guédon, G., Libante, V., Coluzzi, C., Payot, S., és Leblond-Bourget, N. (2017). The Obscure

- World of Integrative and Mobilizable Elements, Highly Widespread Elements that Pirate Bacterial Conjugative Systems. *Genes (Basel)*. 8, 337. doi:10.3390/genes8110337.
- Guglielmini, J., Néron, B., Abby, S. S., Garcillán-Barcia, M. P., de la Cruz, F., és Rocha, E. P. C. (2014). Key components of the eight classes of type IV secretion systems involved in bacterial conjugation or protein secretion. *Nucleic Acids Res.* 42, 5715–27. doi:10.1093/nar/gku194.
- Gunton, J. E., Ussher, J. E. R., Rooker, M. M., Wetsch, N. M., Alonso, G., és Taylor, D. E. (2008). Entry exclusion in the IncHI1 plasmid R27 is mediated by EexA and EexB. *Plasmid* 59, 86–101. doi:10.1016/j.plasmid.2007.11.004.
- Guynet, C., Cuevas, A., Moncalián, G., és de la Cruz, F. (2011). The stb Operon Balances the Requirements for Vegetative Stability and Conjugative Transfer of Plasmid R388. *PLoS Genet.* 7, e1002073. doi:10.1371/journal.pgen.1002073.
- Haase, J., Kalkum, M., és Lanka, E. (1996). TrbK, a small cytoplasmic membrane lipoprotein, functions in entry exclusion of the IncP alpha plasmid RP4. *J. Bacteriol.* 178, 6720–6729. doi:10.1128/JB.178.23.6720-6729.1996.
- Hall, R. M. (2010). Salmonella genomic islands and antibiotic resistance in Salmonella enterica. *Future Microbiol.* 5, 1525–1538. Available at: <http://www.futuremedicine.com/doi/pdf/10.2217/fmb.10.122>.
- Hamidian, M., Holt, K. E., és Hall, R. M. (2015). Genomic resistance island AGI1 carrying a complex class 1 integron in a multiply antibiotic-resistant ST25 Acinetobacter baumannii isolate. *J. Antimicrob. Chemother.* 70, 2519–23. doi:10.1093/jac/dkv137.
- Hancock, S. J., Phan, M.-D., Peters, K. M., Forde, B. M., Chong, T. M., Yin, W.-F., Chan, K.-G., Paterson, D. L., Walsh, T. R., Beatson, S. A., és Schembri, M. A. (2016). Identification of IncA/C Plasmid Replication and Maintenance Genes and Development of a Plasmid Multi-Locus Sequence-Typing Scheme. *Antimicrob. Agents Chemother.* 61, AAC.01740-16. doi:10.1128/AAC.01740-16.
- Harmer, C. J., és Hall, R. M. (2015). The A to Z of A/C plasmids. *Plasmid* 80, 63–82. doi:10.1016/j.plasmid.2015.04.003.
- Harmer, C. J., Hamidian, M., Ambrose, S. J., és Hall, R. M. (2016). Destabilization of IncA and IncC plasmids by SGI1 and SGI2 type Salmonella genomic islands. *Plasmid* 87–88, 51–57. doi:10.1016/j.plasmid.2016.09.003.
- Hegyi, A., Szabó, M., Olasz, F., és Kiss, J. (2017). Identification of oriT and a recombination hot spot in the IncA/C plasmid backbone. *Sci. Rep.* 7, 10595. doi:10.1038/s41598-017-11097-0.
- Helms, M., Ethelberg, S., és Mølbak, K. (2005). International Salmonella Typhimurium DT104 Infections, 1992–2001. *Emerg. Infect. Dis.* 11, 859–867. doi:10.3201/eid1106.041017.
- Hernández-Arriaga, A. M., Chan, W. T., Espinosa, M., és Díaz-Orejas, R. (2014). Conditional Activation of Toxin-Antitoxin Systems: Postsegregational Killing and Beyond. *Microbiol. Spectr.* 2. doi:10.1128/microbiolspec.PLAS-0009-2013.
- Heuer, H., és Smalla, K. (2012). Plasmids foster diversification and adaptation of bacterial populations in soil. *FEMS Microbiol. Rev.* 36, 1083–1104. doi:10.1111/j.1574-6976.2012.00337.x.
- Huguet, K. T., Gonnet, M., Doublet, B., és Cloeckert, A. (2016). A toxin antitoxin system promotes the maintenance of the IncA/C-mobilizable Salmonella Genomic Island 1. *Sci. Rep.* 6, 32285. doi:10.1038/srep32285.
- Humbert, M., Huguet, K. T., Coulombe, F., és Burrus, V. (2019). Entry exclusion of conjugative plasmids of the IncA, IncC, and related untyped incompatibility groups. *J. Bacteriol.* 209, 1–16. doi:10.1128/JB.00731-18.
- Iniesta, A. A. (2014). ParABS System in Chromosome Partitioning in the Bacterium



- Myxococcus xanthus*. *PLoS One* 9, e86897. doi:10.1371/journal.pone.0086897.
- Jackson, R. W., Vinatzer, B., Arnold, D. L., Dorus, S., és Murillo, J. (2011). The influence of the accessory genome on bacterial pathogen evolution. *Mob. Genet. Elements* 1, 55–65. doi:.
- Jagura-Burdzy, G., Kostelidou, K., Pole, J., Khare, D., Jones, A., Williams, D. R., és Thomas C. M. (1999). IncC of broad-host-range plasmid RK2 modulates KorB transcriptional repressor activity In vivo and operator binding in vitro. *J. Bacteriol.* 181, 2807–15. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10217772>.
- Johnson, T., és Lang, K. (2012). IncA/C plasmids: An emerging threat to human and animal health? *Mob. Genet. Elements* 2, 55–58. doi:10.4161/mge.19626.
- Juhas, M., van der Meer, J. R., Gaillard, M., Harding, R. M., Hood, D. W., és Crook, D. W. (2009). Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution. *FEMS Microbiol. Rev.* 33, 376–93. doi:10.1111/j.1574-6976.2008.00136.x.
- Kawalek, A., Wawrzyniak, P., Bartosik, A. A., és Jagura-Burdzy, G. (2020). Rules and exceptions: The role of chromosomal ParB in DNA segregation and other cellular processes. *Microorganisms* 8, 19–22. doi:10.3390/microorganisms8010105.
- Kiss, J., Nagy, B., és Olasz, F. (2012). Stability, Entrapment and Variant Formation of Salmonella Genomic Island 1. *PLoS One* 7, e32497. doi:10.1371/journal.pone.0032497.
- Kiss, J., és Olasz, F. (1999). Formation and transposition of the covalently closed IS30 circle: the relation between tandem dimers and monomeric circles. *Mol. Microbiol.* 34, 37–52. doi:10.1046/j.1365-2958.1999.01567.x.
- Kiss, J., Papp, P. P., Szabó, M., Farkas, T., Murányi, G., Szakállas, E., és Olasz, F. (2015). The master regulator of IncA/C plasmids is recognized by the Salmonella Genomic island SGI1 as a signal for excision and conjugal transfer. *Nucleic Acids Res.* 43. doi:10.1093/nar/gkv758.
- Kiss, J., Szabó, M., Hegyi, A., Douard, G., Praud, K., Nagy, I., Olasz, F., Cloeckeaert, A., és Doublet, B. (2019). Identification and characterization of orit and two mobilization genes required for conjugative transfer of Salmonella genomic island 1. *Front. Microbiol.* 10, 1–16. doi:10.3389/fmicb.2019.00457.
- Lederberg, E. M., és Lederberg, J. (1953). Genetic Studies of Lysogenicity in Escherichia Coli. *Genetics* 38, 51–64. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17247421>.
- Levings, R. S., Lightfoot, D., Partridge, S. R., Hall, R. M., és Djordjevic, S. P. (2005). The genomic island SGI1, containing the multiple antibiotic resistance region of Salmonella enterica serovar Typhimurium DT104 or variants of it, is widely distributed in other S. enterica serovars. *J. Bacteriol.* 187, 4401–9. doi:10.1128/JB.187.13.4401-4409.2005.
- Llanes, C., Gabant, P., Couturier, M., és Michel-Briand, Y. (1994). Cloning and characterization of the Inc A/C plasmid RA1 replicon. *J. Bacteriol.* 176, 3403–3407. doi:10.1128/JB.176.11.3403-3407.1994.
- Mahillon, J., Léonard, C., és Chandler, M. (1999). IS elements as constituents of bacterial genomes. *Res. Microbiol.* 150, 675–687. doi:10.1016/S0923-2508(99)00124-2.
- Marrero, J., és Waldor, M. K. (2005). Interactions between Inner Membrane Proteins in Donor and Recipient Cells Limit Conjugal DNA Transfer. *Dev. Cell* 8, 963–970. doi:10.1016/j.devcel.2005.05.004.
- Mead, P. S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L. F., Bresee, J. S., Shapiro, C., Griffin, P. M., és Tauxe, R. V. (1999). Food-Related Illness and Death in the United States. *Emerg. Infect. Dis.* 5, 607–625. doi:10.3201/eid0505.990502.
- Meunier, D., Boyd, D., Mulvey, M. R., Baucheron, S., Mammina, C., Nastasi, A., Chaslus-Dancla, E., és Cloeckeaert, A. (2002). Salmonella enterica serotype Typhimurium DT 104 antibiotic resistance genomic island I in serotype paratyphi B. *Emerg. Infect. Dis.* 8, 430–3. doi:10.3201/eid0804.010375.

- Miller, J. H. (1972). Experiments in molecular genetics. *Cold Spring Harb. Lab. Press. Cold Spring Harb. NY*. Available at: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17416361](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17416361).
- Mulvey, M. R., Boyd, D., Olson, A. B., Doublet, B., és Cloeckaert, A. (2006). The genetics of Salmonella genomic island 1. *Microbes Infect.* 8, 1915–1922. doi:10.1016/j.micinf.2005.12.028.
- Murányi, G., Szabó, M., Olasz, F., és Kiss, J. (2016). Determination and analysis of the putative AcaCD-responsive promoters of salmonella genomic island 1. *PLoS One* 11. doi:10.1371/journal.pone.0164561.
- Nesmelova, I. V., és Hackett, P. B. (2010). DDE transposases: Structural similarity and diversity. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 62, 1187–1195. doi:10.1016/j.addr.2010.06.006.
- Orlek, A., Stoesser, N., Anjum, M. F., Doumith, M., Ellington, M. J., Peto, T., Crook, D., Woodford, N., Walker, A. S., Phan, H., és Sheppard, A. E. (2017). Plasmid Classification in an Era of Whole-Genome Sequencing: Application in Studies of Antibiotic Resistance Epidemiology. *Front. Microbiol.* 8. doi:10.3389/fmicb.2017.00182.
- Pohlman, R. F., Genetti, H. D., és Winans, S. C. (1994). Entry Exclusion of the IncN Plasmid pKM101 Is Mediated by a Single Hydrophilic Protein Containing a Lipid Attachment Motif. *Plasmid* 31, 158–165. doi:10.1006/plas.1994.1017.
- Poulin-Laprade, D., Carraro, N., és Burrus, V. (2015a). The extended regulatory networks of SXT/R391 integrative and conjugative elements and IncA/C conjugative plasmids. *Front. Microbiol.* 6. doi:10.3389/fmicb.2015.00837.
- Poulin-Laprade, D., Matteau, D., Jacques, P.-É., Rodrigue, S., és Burrus, V. (2015b). Transfer activation of SXT/R391 integrative and conjugative elements: unraveling the SetCD regulon. *Nucleic Acids Res.* 43, 2045–2056. doi:10.1093/nar/gkv071.
- Ramsay, J. P., Kwong, S. M., Murphy, R. J. T., Yui Eto, K., Price, K. J., Nguyen, Q. T., O'Brien, F. G., Grubb, W. B., Coombs, G. W., és Firth, N. (2016). An updated view of plasmid conjugation and mobilization in Staphylococcus. *Mob. Genet. Elements* 6, e1208317. doi:10.1080/2159256X.2016.1208317.
- Rice, P., és Kiyoshi, M. (1995). Structure of the bacteriophage Mu transposase core: A common structural motif for DNA transposition and retroviral integration. *Cell* 82, 209–220. doi:10.1016/0092-8674(95)90308-9.
- Robart, A. R., és Zimmerly, S. (2005). Group II intron retroelements: function and diversity. *Cytogenet. Genome Res.* 110, 589–597. doi:10.1159/000084992.
- Sakuma, T., Tazumi, S., Furuya, N., és Komano, T. (2013). ExcA proteins of IncII plasmid R64 and IncIy plasmid R621a recognize different segments of their cognate TraY proteins in entry exclusion. *Plasmid* 69, 138–145. doi:10.1016/j.plasmid.2012.11.004.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., és Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Schmidt, H., és Hensel, M. (2004). Pathogenicity Islands in Bacterial Pathogenesis. *Clin. Microbiol. Rev.* 17, 14–56. doi:10.1128/CMR.17.1.14-56.2004.
- Schultz, E., Barraud, O., Madec, J.-Y., Haenni, M., Cloeckaert, A., Ploy, M.-C., és Doublet, B. (2017). Multidrug Resistance Salmonella Genomic Island 1 in a *Morganella morganii* subsp. *morganii* Human Clinical Isolate from France. *mSphere* 2. doi:10.1128/mSphere.00118-17.
- Scott, J. R., és Churchward, G. G. (1995). Conjugative Transposition. *Annu. Rev. Microbiol.* 49, 367–397. doi:10.1146/annurev.mi.49.100195.002055.
- Shintani, M., és Nojiri, H. (2013). “Mobile Genetic Elements (MGEs) Carrying Catabolic Genes,” in *Management of Microbial Resources in the Environment* (Dordrecht:

- Springer Netherlands), 167–214. doi:10.1007/978-94-007-5931-2\_8.
- Shintani, M., Sanchez, Z. K., és Kimbara, K. (2015). Genomics of microbial plasmids: classification and identification based on replication and transfer systems and host taxonomy. *Front. Microbiol.* 6. doi:10.3389/fmicb.2015.00242.
- Siebor, E., de Curraize, C., és Neuwirth, C. (2019). Identification of AGI1-A, a variant of Acinetobacter genomic island 1 (AGI1), in a French clinical isolate belonging to the Enterobacter cloacae complex. *J. Antimicrob. Chemother.* 74, 311–314. doi:10.1093/jac/dky442.
- Siguier, P., Gourbeyre, E., Varani, A., Ton-Hoang, B., és Chandler, M. (2015). Everyman's Guide to Bacterial Insertion Sequences. *Microbiol. Spectr.* 3. doi:10.1128/microbiolspec.MDNA3-0030-2014.
- Singer, H. M., Erhardt, M., és Hughes, K. T. (2013). RflM Functions as a Transcriptional Repressor in the Autogenous Control of the Salmonella Flagellar Master Operon flhDC. *J. Bacteriol.* 195, 4274–4282. doi:10.1128/JB.00728-13.
- Smillie, C., Garcillán-Barcia, M. P., Francia, M. V., Rocha, E. P. C., és de la Cruz, F. (2010). Mobility of plasmids. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 74, 434–52. doi:10.1128/MMBR.00020-10.
- Smith, M. C. M., és Thorpe, H. M. (2002). Diversity in the serine recombinases. *Mol. Microbiol.* 44, 299–307. doi:10.1046/j.1365-2958.2002.02891.x.
- Soliman, A. M., Shimamoto, T., Nariya, H., és Shimamoto, T. (2018). Emergence of Salmonella Genomic Island 1 Variant SGI1-W in a Clinical Isolate of *Providencia stuartii* from Egypt. *Antimicrob. Agents Chemother.* 63. doi:10.1128/AAC.01793-18.
- Soutourina, O., Kolb, A., Krin, E., Laurent-Winter, C., Rimsky, S., Danchin, A., és Bertin, P. (1999). Multiple control of flagellum biosynthesis in *Escherichia coli*: role of H-NS protein and the cyclic AMP-catabolite activator protein complex in transcription of the flhDC master operon. *J. Bacteriol.* 181, 7500–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10601207>.
- Szabó, M., Nagy, T., Wilk, T., Farkas, T., Hegyi, A., Olasz, F., és Kiss, J. (2016). Characterization of Two Multidrug-Resistant IncA/C Plasmids from the 1960s by Using the MinION Sequencer Device. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60, 6780–6786. doi:10.1128/AAC.01121-16.
- Threlfall, E. J. (2000). Epidemic salmonella typhimurium DT 104--a truly international multiresistant clone. *J. Antimicrob. Chemother.* 46, 7–10. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10882682>.
- Tomono, M., Shiozaki, M., és Ikeda, H. (1989). Formation of  $\lambda$  Transducing Phage In Vitro: Involvement of DNA Gyrase1. *J. Biochem.* 105, 423–428. doi:10.1093/oxfordjournals.jbchem.a122680.
- Vandecraen, J., Chandler, M., Aertsen, A., és Van Houdt, R. (2017). The impact of insertion sequences on bacterial genome plasticity and adaptability. *Crit. Rev. Microbiol.* 43, 709–730. doi:10.1080/1040841X.2017.1303661.
- Wallden, K., Rivera-Calzada, A., és Waksman, G. (2010). Microreview: Type IV secretion systems: versatility and diversity in function. *Cell. Microbiol.* 12, 1203–1212. doi:10.1111/j.1462-5822.2010.01499.x.
- Wang, R., Yu, D., Zhu, L., Li, J., Yue, J., és Kan, B. (2015). IncA/C plasmids harboured in serious multidrug-resistant *Vibrio cholerae* serogroup O139 strains in China. *Int. J. Antimicrob. Agents* 45, 249–254. doi:10.1016/j.ijantimicag.2014.10.021.
- Welch, T. J., Fricke, W. F., McDermott, P. F., White, D. G., Rosso, M.-L., Rasko, D. A., Mammel, M. K., Eppinger, M., Rosovitz, M. J., Wagner, D., Rahalison, L., Leclerc, J. E., Hinshaw, J. M., Lindler, L. E., Cebula, T. A., Carniel, E., és Ravel, J. (2007). Multiple Antimicrobial Resistance in Plague: An Emerging Public Health Risk. *PLoS*

- One* 2, e309. doi:10.1371/journal.pone.0000309.
- Whittle, G., Shoemaker, N. B., és Salyers, A. A. (2002). The role of *Bacteroides* conjugative transposons in the dissemination of antibiotic resistance genes. *Cell. Mol. Life Sci.* 59, 2044–2054. doi:10.1007/s000180200004.
- Wozniak, C. E., és Hughes, K. T. (2008). Genetic Dissection of the Consensus Sequence for the Class 2 and Class 3 Flagellar Promoters. *J. Mol. Biol.* 379, 936–952. doi:10.1016/j.jmb.2008.04.043.
- Wozniak, R. A. F., Fouts, D. E., Spagnoletti, M., Colombo, M. M., Ceccarelli, D., Garriss, G., Déry, C., Burrus, V., Waldor, M. (2009). Comparative ICE Genomics: Insights into the Evolution of the SXT/R391 Family of ICEs. *PLoS Genet.* 5, e1000786. doi:10.1371/journal.pgen.1000786.
- Wozniak, R. A. F., és Waldor, M. K. (2009). A Toxin–Antitoxin System Promotes the Maintenance of an Integrative Conjugative Element. *PLoS Genet.* 5, e1000439. doi:10.1371/journal.pgen.1000439.
- Yamaichi, Y., és Niki, H. (2000). Active segregation by the *Bacillus subtilis* partitioning system in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 14656–14661. doi:10.1073/pnas.97.26.14656.

## **IX. Publikációk és konferenciák listája**

### **A dolgozat alapjául szolgáló közlemények:**

János Kiss, Péter Pál Papp, Mónika Szabó, Tibor Farkas, Gábor Murányi, Erik Szakállas, Ferenc Olasz (2015) The master regulator of IncA/C plasmids is recognized by the Salmonella Genomic island SGI1 as a signal for excision and conjugal transfer. Nucleic Acids Res. 43 (18): 8735-8745 doi: 10.1093/nar/ gkv758

Gábor Murányi, Mónika Szabó, Ferenc Olasz, János Kiss (2016) Determination and Analysis of the Putative AcaCD-Responsive Promoters of Salmonella Genomic Island 1. PLoS ONE 11(10): e0164561. doi:10.1371/journal.pone.0164561

### **Nemzetközi konferencia (előadás):**

Gábor Murányi, Mónika Szabó, János Kiss. (2016) Gaining Multidrug Resistance by Acquisition of Salmonella Genomic Island 1: Excision, Conjugal Transfer and Effects on the Helper Plasmid Stability. International Symposium Salmonella and Salmonellosis - i3s Session 4 Saint-Malo, France, 6-8 June, 2016

### **Nemzetközi konferenciák (posztterek):**

Gábor Murányi, János Kiss, Ferenc Olasz (2015) Deletion Analysis of Salmonella Genomic Island 1 Hungarian Molecular Life Sciences. 27-29 March 2015, Eger, Hungary

Gábor Murányi, Mónika Szabó, János Kiss, Ferenc Olasz (2015) Excision and Conjugal Transfer of a Genomic Island: Investigations of SGI1-encoded ORFs of Unknown Functions. 17th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology. 8-10 July 2015, An Eötvös Scientific Conference, Eötvös Loránd University Convention Centre, Budapest, Hungary

Gábor Murányi, Mónika Szabó, János Kiss Genetic Dissection of Integrative Mobilizable Element Salmonella Genomic Island 1. (2015) The Mobile Genome: Genetic and Physiological Impacts of Transposable Elements EMBO-EMBL Symposium. 16-19 September 2015, EMBL Heidelberg, Germany

Gábor Murányi, Mónika Szabó, János Kiss. (2016) Analysis of the Interactions between Salmonella Genomic Island 1 and IncA/C Helper Plasmids. 5th ASM Conference on Salmonella. 29 August-1 September 2016, Potsdam, Germany

Gábor Murányi, Mónika Szabó, János Kiss. (2017) The effects of homologous activators of SGI1 and IncA/C plasmids on SGI1-related AcaCD-responsive promoters, Hungarian Molecular Life Sciences. 31 March-2 April 2017, Eger, Hungary

Gábor Murányi, Mónika Szabó, János Kiss. The effect of FlhDC homologs of Incompatibility group A/C plasmids and Salmonella Genomic Island 1 on AcaCD-responsive promoters. 7th Congress of European Microbiologists, FEMS. 9-13 July 2017, Valencia, Spain

### **Hazai konferenciák (előadás):**

Murányi Gábor, Szabó Mónika és Kiss János: A Salmonella genomic island 1 deléziós analízise, XIV. Genetikai műhelyek Magyarországon minikonferencia, Szeged, 2015. szeptember 4.

## X. Köszönetnyilvánítás

Köszönöm témavezetőmnek, **Dr. Kiss Jánosnak**, hogy tapasztalatával, javaslataival és megjegyzéseivel fáradhatatlanul segítette munkámat az elmúlt években, hiszen rengeteget tanultam Tőle. Köszönöm, hogy hozzá fordulhattam bármilyen probléma vagy gond esetén, ha elakadtam, hiszen mindig választ kaptam kérdéseimre. Továbbá köszönöm állandó támogatását, bármilyen ötlet is fordult meg a fejemben.

Köszönöm **Dr. Szabó Mónikának** a munkák során nyújtott segítségét, sokat tanultam Tőle és köszönöm javaslatait és megjegyzéseit doktori munkámmal kapcsolatban.

Köszönöm **Dr. Olasz Ferencnek** a hasznos javaslatokat, amelyeket munkámban tudtam hasznosítani.

Köszönöm **Sztánáné Keresztúri Erikának**, **Turai Máriának**, **Könczólné Icának** és **Bogár Andreának** a rengeteg technikai segítséget.

Köszönöm laborunk jelenlegi és volt tagjainak, **Hegyi Annának**, **Veress Alexandrának** és **Nagy Istvánnak** a közös élményeket, legyen szó szakmai vagy kevésbé szakmai közös programokról, diskurzusokról, konferenciákról.

Igazán nagy élmény volt az elmúlt közel 6 év, mindig örömmel fogok visszagondolni erre az időszakra és ezért köszönettel tartozom a Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóintézet valamennyi munkatársának is.

Köszönöm **Dr. Vellai Tibornak**, hogy annak idején ajánlotta számomra az MBK-t és hogy doktori tanulmányaimat az ELTE Klasszikus és Molekuláris Genetika Programjának keretein belül végezhettem el.

Köszönöm a NAIK-nak, hogy a kutatói utánpótlást elősegítő program keretein belül elkezdhettem munkámat.

Köszönöm feleségemnek, **Murányi-Győri Grétának**, hogy türelmes volt a karantén alatt, amíg elkészült ez a munka, és ha arról volt szó, hogy hétvégén is dolgozni kell a tudományos kíváncsiság miatt, akkor sokszor elkísért, így ez az utazásunk is közös volt.

Köszönöm szüleimnek, **Keszerice Kamillának** és **dr. Ormai Lászlónak** állandó támogatásukat, türelmüket és biztatásukat.

És nem utolsósorban köszönöm barátaimnak, **Szaker Henrik Mihálynak** és **Első Dávidnak**, hogy megoszthattam velük élményeimet munkámmal kapcsolatban.

## XI. Mellékletek

### Melléklet 1: 8. táblázat Baktérium törzsek listája

Baktériumtörzs	Genotípus	Referencia
<i>E. coli</i> TG1	<i>supE hsdΔ5 thiΔ(lac-proAB) F<sup>+</sup>[traD36 proAB<sup>+</sup> lacIq lacZΔM15]</i>	(Gibson, 1984)
<i>E. coli</i> TG1Nal	TG1 NalR származéka	(Kiss és mtsai, 2012)
<i>E. coli</i> TG90	TG1 <i>pcn B80 zad::Tn10</i> (TcR) származéka	(Gonzy-Treboul és mtsai, 1992)
<i>E. coli</i> Tuner DE3	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm lacY1</i> (DE3)	(Kiss és mtsai, 2015)
<i>E. coli</i> TG1Nal/R55ΔTn6187	R55ΔTnSmS CmR transzkonjugánsa TG1Nal-ban	(Kiss és mtsai, 2019)
<i>E. coli</i> TG1Nal::SGII-C	NalR SmR SpR SuR, SGII-C transzkonjugáns TG1Nal-ban. Egy kópia SGII-C az <i>attB</i> helyre integrálódva ( <i>trmE</i> )	(Kiss és mtsai, 2015)
<i>E. coli</i> TG1Nal::SGII-CΔ <i>bind site</i>	TG1Nal::SGII-C P <sub>xis</sub> AcaCD kötőhelyének deléciós mutánsa (primerek: <i>sgiPxisdelfor1-sgiPxisdelfor2</i> )	(Kiss és mtsai, 2015)
<i>E. coli</i> TG1Nal::SGII-CΔ <i>upstream</i>	TG1Nal::SGII-C P <sub>xis</sub> <i>upstream</i> régió deléciós mutánsa (primerek: <i>sgiPxisdelfor2-sgiPxisdelfor2</i> )	(Kiss és mtsai, 2015)
<i>E. coli</i> TG1Nal::SGII-CΔ <i>bind site</i> /R55	TG1Nal::SGII-C P <sub>xis</sub> AcaCD kötőhelyének deléciós mutánsa, R55 transzkonjugáns NalRSmRSpRSuRCmRKmRApRFloR	(Kiss és mtsai, 2015)
<i>E. coli</i> TG1Nal::SGII-CΔ <i>upstream</i> /R55	TG1Nal::SGII-C P <sub>xis</sub> <i>upstream</i> régió deléciós mutánsa, R55 transzkonjugáns NalRSmRSpRSuRCmRKmRApRFloR	(Kiss és mtsai, 2015)
<i>E. coli</i> TG1Nal::SGII-C/R16a	TG1Nal::SGII-C, R16a-t tartalmazó transzkonjugáns, NalRSmRSpRSuRCmRKmRApR	(Kiss és mtsai, 2015)
<i>E. coli</i> TG1Nal::SGII-C/R16aΔ <i>acaCD</i>	TG1Nal::SGII-C/R16a <i>acaCD</i> deléciója NalRSmRSpRSuRCmRKmRApR	(Murányi és mtsai, 2016)
<i>E. coli</i> Tuner::SGII-C	SGII-C transzkonjugáns Tuner (DE3)-ban, egy kópiában integrálódott <i>trmE</i> 3' végébe, SmRSpRSuR	(Kiss és mtsai, 2015)
<i>E. coli</i> TG1Nal::SGII-CΔS003	TG1Nal::SGII-CΔS003 deléciós mutánsa (primerek: 003delfor-003delrev), NalRSmRSpRSuR	jelen munka
<i>E. coli</i> TG1Nal::SGII-CΔS004	TG1Nal::SGII-CΔS004 deléciós mutánsa (primerek: 004delfor-004delrev), NalRSmRSpRSuR	jelen munka
<i>E. coli</i> TG1Nal::SGII-CΔS003-S005	TG1Nal::SGII-CΔS003-S005 deléciós mutánsa (primerek: 003delfor-005delrev), NalRSmRSpRSuR	jelen munka
<i>E. coli</i> TG1Nal::SGII-CΔS003-S004	TG1Nal::SGII-CΔS003-S004 deléciós mutánsa (primerek: 003delfor-004delrev), NalRSmRSpRSuR	jelen munka
<i>E. coli</i> TG1Nal::SGII-CΔS004-S005	TG1Nal::SGII-CΔS004-S005 deléciós mutánsa (primerek: 004delfor-005delrev), NalRSmRSpRSuR	jelen munka
<i>E. coli</i> TG1Nal::SGII-CΔ <i>flhDC</i> <sub>SGII</sub>	TG1Nal::SGII-CΔ <i>flhDC</i> <sub>SGII</sub> deléciós mutánsa (primerek: <i>sgi006delfor-sgi007delrev</i> ), NalRSmRSpRSuR	jelen munka
<i>E. coli</i> TG1Nal::SGII-CΔS006-S012	TG1Nal::SGII-CΔS006-S012 deléciós mutánsa (primerek: 006delfor-012delrev), NalRSmRSpRSuR	jelen munka
<i>E. coli</i> TG1Nal::SGII-CΔS013-S018	TG1Nal::SGII-CΔS013-S018 deléciós mutánsa (primerek: <i>sgi013delfor-sgi018delrev</i> ), NalRSmRSpRSuR	jelen munka
<i>E. coli</i> TG1Nal::SGII-CΔS019	TG1Nal::SGII-CΔS019 deléciós mutánsa, NalRSmRSpRSuR	(Kiss és mtsai, 2019)
<i>E. coli</i> TG1Nal::SGII-CΔS020	TG1Nal::SGII-CΔS020 deléciós mutánsa, NalRSmRSpRSuR	(Kiss és mtsai, 2019)
<i>E. coli</i> TG1Nal::SGII-CΔS021	TG1Nal::SGII-CΔS021 deléciós mutánsa, NalRSmRSpRSuR	Kiss János, nem publikált
<i>E. coli</i> TG1Nal::SGII-CΔS022	TG1Nal::SGII-CΔS022 deléciós mutánsa, NalRSmRSpRSuR	Kiss János, nem publikált
<i>E. coli</i> TG1Nal::SGII-CΔS023-S026	TG1Nal::SGII-CΔS023-S026 deléciós mutánsa (primerek: 023delfor-026delrev), NalRSmRSpRSuR	jelen munka
<i>E. coli</i> TG1Nal::SGII-CΔS023-S027	TG1Nal::SGII-CΔS023-S027 deléciós mutánsa (primerek: 023delfor-027delrev), NalRSmRSpRSuR	jelen munka
<i>E. coli</i> TG1Nal::SGII-CΔS044	TG1Nal::SGII-CΔS044 deléciós mutánsa (primerek: 044delfor-minidelrev), NalRSmRSpRSuR	jelen munka
<i>E. coli</i> TG1Nal::SGII-C/R55ΔTn6187	R55ΔTnSmS CmR transzkonjugánsa TG1Nal::SGII-C-ben (NalRSmRSpR)	jelen munka
<i>E. coli</i> TG1Nal::SGII-CΔ <i>flhDC</i> <sub>SGII</sub> /R55ΔTn6187	TG1Nal::SGII-CΔ <i>flhDC</i> <sub>SGII</sub> deléciós mutánsa, R55ΔTnSmS transzkonjugáns, NalRSmRSpRSuR CmR	jelen munka
<i>E. coli</i> TG1Nal::SGII-CΔS013-S018/R55ΔTn6187	TG1Nal::SGII-CΔS013-S018 deléciós mutánsa (primerek: <i>sgi013delfor-sgi018delrev</i> ), R55ΔTnSmS transzkonjugáns, NalRSmRSpRSuRCmR	jelen munka

## Melléklet 2: 9. táblázat Plazmidok listája

Név	Releváns információk	Részletes leírás/Referencia
pJKI88	KmR, p15A klónozó vektor	(Kiss és mtsai, 2012)
pJKI391	pJKI88 származék, P <sub>tac</sub> -ot tartalmazó expressziós vektor, amelyet egy MCS és <i>lacI<sup>q</sup></i> gén követ	(Kiss és mtsai, 2015)
pJKI627	pJKI88 származék, KmR, <i>attB<sub>Ec</sub></i>	(Kiss és mtsai, 2012)
pJKI633	pJKI88 származék, KmR, <i>attB<sub>Ec</sub></i>	Melléklet 3, jelen munka
pJKI666	pBeloBac11, GmR, F replikációjú klónozó vektor, <i>attB<sub>ST</sub></i>	(Kiss és mtsai, 2012)
pJKI669	pJKI88 származék, pJKI666::SGI128S1 (d1 deléciót hordozó SGI1 ld. Kiss és mtsai, 2012)	Melléklet 3, jelen munka
pJKI670	pJKI88 származék, KmR, SGI1: <i>int</i> , <i>xis</i> , <i>oriV</i> , <i>repA</i> -S004, P <sub>S004</sub> , DR, S013-S014, NCR, S015-S019, S020 disztális fragment	Melléklet 3, jelen munka
pJKI828	pJKI815 származék, R55 166138-169131 bp-ig tartó szegmentje (teljes operon, ORF 131-134)	(Kiss és mtsai, 2015)
pJKI839	pJKI828 GmR származéka	(Kiss és mtsai, 2015)
pJKI861	Klónozó vektor β-galaktózidáz mérésekhez, promóter nélküli <i>lacZ</i> , közrefogva MCS-tal és SmR Ω kazettával	(Kiss és mtsai, 2015)
pJKI878	pET16b származék, R55 <i>acaCD</i> expressziója P <sub>T7</sub> promóterről	(Kiss és mtsai, 2015)
pJKI888	pJKI391 származék, R55 <i>acaCD</i> expressziója P <sub>tac</sub> promóterről	(Kiss és mtsai, 2015)
pJKI990	pJKI861 származék, klónozó vektor β-galaktózidáz mérésekhez, <i>rrnB</i> terminátor, CmR	(Kiss és mtsai, 2015)
pJKI991	pJKI990 származék, tesztelő plazmid, P <sub>xis</sub> proximális fragment (1947-2100 bp)	(Kiss és mtsai, 2015)
pJKI992	pJKI990 származék, tesztelő plazmid, P <sub>xis</sub> disztális fragment (2101-2306 bp)	(Kiss és mtsai, 2015)
pJKI1003	pJKI990 származék, tesztelő plazmid, P <sub>xis</sub> régió (1947-2306 bp)	(Kiss és mtsai, 2015)
pJKI1004	pJKI990 származék, tesztelő plazmid, P <sub>xis</sub> proximális fragment (1947-2078 bp)	(Kiss és mtsai, 2015)
pJKI1005	pJKI990 származék, tesztelő plazmid, P <sub>xis</sub> proximális fragment (1947-2113 bp)	(Kiss és mtsai, 2015)
pJKI1013	pJKI990 származék, tesztelő plazmid, P <sub>xis</sub> proximális fragment (1947-2052 bp)	(Kiss és mtsai, 2015)
pJKI1014	pJKI990 származék, tesztelő plazmid, P <sub>xis</sub> proximális fragment (1947-2043 bp)	(Kiss és mtsai, 2015)
pJKI1015	pJKI990 származék, tesztelő plazmid, P <sub>xis</sub> proximális fragment (1947-2030 bp)	(Kiss és mtsai, 2015)
pJKI1016	pJKI990 származék, tesztelő plazmid, P <sub>xis</sub> proximális fragment (1947-2012 bp)	(Kiss és mtsai, 2015)
pJKI1017	pJKI990 származék, tesztelő plazmid, P <sub>xis</sub> proximális fragment (1947-2113 bp), -35 box mutáns (2003-2008 bp)	(Kiss és mtsai, 2015)
pJKI1036	pJKI391 expressziós vektor GmR származéka	(Murányi és mtsai, 2016)
pJKI1038	pJKI888 expressziós vektor GmR származéka	(Murányi és mtsai, 2016)
pJKI1040	pGMY6 expressziós vektor GmR származéka	(Murányi és mtsai, 2016)
pJKI1042	pBluescript SK vektor, <i>repA</i> expresszió	(Murányi és mtsai, 2016)
pJKI1043	pBluescript SK vektor, S004 <sub>L</sub> expresszió	(Murányi és mtsai, 2016)
pJKI1044	pBluescript SK vektor, S004 <sub>S</sub> expresszió	(Murányi és mtsai, 2016)



Név	Releváns információk	Részletes leírás/Referencia
pJKI1048	pJKI391 SmR SpR származéka, <i>repA</i> P <sub>tac</sub> promóter szabályozása alatt, <i>rnnB</i> terminator	(Murányi és mtsai, 2016)
pJKI1049	pJKI391 SmR SpR származéka, S004 <sub>L</sub> P <sub>tac</sub> promóter szabályozása alatt, <i>rnnB</i> terminator	(Murányi és mtsai, 2016)
pJKI1050	pJKI391 SmR SpR származéka, S004 <sub>S</sub> P <sub>tac</sub> promóter szabályozása alatt, <i>rnnB</i> terminator	(Murányi és mtsai, 2016)
pJKI1074	pJKI88 származék, KmR SmR, SGI1: SmR $\Omega$ fragment, S013-S014, NCR, S015 disztális fragment	Melléklet 3, jelen munka
pMSZ953	pJKI990 tesztelő plazmid származék, SGI1 P <sub>S005</sub> régió (6385-6490 bp)	(Murányi és mtsai, 2016)
pMSZ954	pJKI990 tesztelő plazmid származék, SGI1 P <sub>S012</sub> régió (13421-13564 bp)	(Murányi és mtsai, 2016)
pMSZ955	pJKI990 tesztelő plazmid származék, SGI1 P <sub>S018</sub> régió (16189-16462 bp)	(Murányi és mtsai, 2016)
pMSZ956	pJKI990 tesztelő plazmid származék, SGI1 P <sub>S003</sub> régió (3261-3639 bp)	(Murányi és mtsai, 2016)
pMSZ965	pJKI990 tesztelő plazmid származék, SGI1 P <sub>S004</sub> régió (3474-3639 bp)	(Murányi és mtsai, 2016)
pGMY3	pET-16b származék, <i>flhDC</i> SGI1 expressziója P <sub>T7</sub> promóterről, ApR	(Kiss és mtsai, 2015)
pGMY6	pJKI391 származék, <i>flhDC</i> SGI1 expressziója P <sub>tac</sub> promóterről, ApR	(Murányi és mtsai, 2016)
pGMY8	pJKI391 származék, expressziós vektor, SmR SpR	(Murányi és mtsai, 2016)
pGMY11	pJKI88 származék, KmR, SGI1: S013-S014, NCR, S015-S018	Melléklet 3, jelen munka
pGMY12	pJKI88 származék, KmR, SGI1: S013-S014	Melléklet 3, jelen munka
pGMY14	pJKI88 származék, KmR, SGI1: <i>int</i> , <i>xis</i> , <i>oriV</i> , <i>repA</i> -S004 disztális fragment, S015 disztális fragment, S016-S018, S019, S020 disztális fragment	Melléklet 3, jelen munka
pGMY15	pJKI88 származék, KmR: SGI1: <i>int</i> proximális fragment, <i>oriV-repA</i> , P <sub>S004</sub> , DR, S013-S014, NCR, S015-S019, S020 disztális fragment	Melléklet 3, jelen munka
pGMY20	pJKI88 származék, KmR, SGI1: <i>int</i> , <i>xis</i> , <i>oriV</i> , <i>repA</i> , S004, P <sub>S004</sub> , DR, S013 proximális fragment, S015-S019, S020 disztális fragment	Melléklet 3, jelen munka
pGMY23	pJKI88 származék, KmR, SGI1: <i>repA</i> -S004, P <sub>S004</sub> , DR, S013-S014	Melléklet 3, jelen munka
pGMY28	pJKI88 származék, KmR, SGI1: <i>int</i> proximális fragment, <i>oriV</i> -S004, P <sub>S004</sub> , DR, S013-S014, NCR, S015, S016 disztális fragment	Melléklet 3, jelen munka
pGMY29	pJKI88 származék, KmR, SGI1: <i>repA</i> -S004, P <sub>S004</sub> , DR, S013-S014, NCR, S015, S016 disztális fragment	Melléklet 3, jelen munka
pGMY32	pJKI88 származék, KmR, SGI1: <i>repA</i> -S004, P <sub>S004</sub> , DR, S013-S014, NCR, S015 disztális fragment	Melléklet 3, jelen munka
pGMY33	pJKI88 származék, KmR, SGI1: S004 proximális fragment, P <sub>S004</sub> , DR, S013-S014, NCR, S015 disztális fragment	Melléklet 3, jelen munka
pGMY34	pJKI88 származék, KmR, SGI1: P <sub>S012</sub> , S013-S014	Melléklet 3, jelen munka
pGMY38	pJKI88 származék, KmR, SGI1: P <sub>S012</sub> , S013-S014, NCR, S015 disztális fragment	Melléklet 3, jelen munka
pGMY39	pJKI88 származék, KmR, SGI1: P <sub>S012</sub> , módosított DR, S013-S014, NCR, S015 disztális fragment	Melléklet 3, jelen munka
pGMY40	pJKI88 származék, KmR, SGI1: P <sub>S012</sub> módosított AcaCD kötőhely, DR, S013-S014, NCR, S015 disztális fragment	Melléklet 3, jelen munka
pGMY41	pJKI88 származék, KmR, SGI1: P <sub>S012</sub> , DR, S013	Melléklet 3, jelen munka

Név	Releváns információk	Részletes leírás/Referencia
	<i>frameshift</i> mutáns, S014, NCR, S015 disztális fragment	
pGMY42	pJKI88 származék, KmR, SGI1: P <sub>S012</sub> , DR, S013, S014 <i>frameshift</i> mutáns, NCR, S015 disztális fragment	Melléklet 3, jelen munka
pGMY43	pJKI88 származék, KmR, SGI1: DR, S013-S014, NCR	Melléklet 3, jelen munka
pGMY44	pJKI88 származék, KmR, SGI1: DR, S013 proximális fragment, S014 disztális fragment, NCR, S015 disztális fragment	Melléklet 3, jelen munka
pGMY47	pJKI88 származék, KmR, SGI1: DR, S013 disztális fragment, S014, NCR, S015 disztális fragment	Melléklet 3, jelen munka
pGMY49	pJKI88 származék, KmR, SGI1: DR mutáns, S013-S014, NCR, S015 disztális fragment	Melléklet 3, jelen munka
pGMY50	pJKI88 származék, KmR, SGI1: DR, S013 proximális fragment, S014 mediális fragment, NCR <i>downstream</i> (56 bp), S015 mediális fragment	Melléklet 3, jelen munka
pGMY51	pJKI88 származék, KmR, SGI1: DR, S013 proximális fragment, S014 mediális fragment, NCR <i>upstream</i> (172 bp), S015 disztális fragment	Melléklet 3, jelen munka
pGMY52	pJKI88 származék, KmR, SGI1: DR, S013 proximális fragment, S014 mediális fragment, NCR <i>upstream</i> (56 bp), S015 disztális fragment	Melléklet 3, jelen munka
pCP20	ApR CmR plazmid, hőérzékeny replikációs rendszer (30°C), hőindukciós (42°C) FLP szintézis	(Cherepanov and Wackernagel, 1995)
pET16b	ApR expressziós vektor, P <sub>T7</sub>	Novagen
pKD3	CmR ApR r6kγ-alapú PCR templát plazmid egy lépéses géninaktivációhoz	(Datsenko and Wanner, 2000)
pKD4	KmR ApR r6kγ-alapú PCR templát plazmid egy lépéses géninaktivációhoz	(Datsenko and Wanner, 2000)
pKD46	hőérzékeny pSC101 replikációs rendszer (30°C-on stabil), arabinózzal indukálható λ Red rekombináza	(Datsenko and Wanner, 2000)
R16a	IncC plazmid, <i>tra+</i> ApR KmR SuR	(Douard és mtsai, 2010)
R16aΔ <i>acaC</i> <i>D</i>	R16a <i>acaCD</i> KO mutáns, Ap <sup>R</sup> Km <sup>R</sup> Su <sup>R</sup>	(Kiss és mtsai, 2015)
R55	IncC plazmid, <i>tra+</i> ApR KmR CmR FloR GmR SuR	(Douard és mtsai, 2010)
R55ΔTn6187	R55 Tn6187 KO mutánsa, CmR	(Kiss és mtsai, 2019)

### Melléklet 3: Plazmidok részletes leírása

A pJKI666::SGI1<sub>28S1</sub> egy SGI1 deléciós variánst hordozó „csapdázó” plazmid (Kiss és mtsai, 2012). A pJKI666::SGI1<sub>28S1</sub> csapdázó vektorból *NotI* fragmentként a d1 és S deléciót hordozó SGI1 (kromoszomális eredetű SGI1 a két oldalon a határoló kromoszomális szekvenciákkal (*downstream*: 810 bp, *upstream* 220 bp) (Kiss és mtsai, 2012) klónozva lett a *NotI*-el hasított pJKI633 vektorba, amely a p15a alapú pJKI627 *PstI* helyének feltöltésével készült (Kiss és mtsai, 2012). Az így nyert pJKI669-ből *NcoI* hasítással a kromoszomális *downstream* régió egy része (túlnyúló *downstream* szekvencia 810 bp-nyiról 310 bp-nyira csökken) és az SGI1 3' végének egy nagyobb része el lett távolítva ( $\Delta$ 16970-43079 bp). Az így kapott pJKI670 plazmidot használtuk pozitív kontrollként stabilitási vizsgálatainkhoz (pJKI670: 220 bp kromoszomális *thdF* 3' vég, SGI1: 1-3618 bp, 13546-16970 bp, kromoszomális *downstream* régió, retronfág *int2* génje 310 bp).

A pGMY11 esetében a S013Ecofor és S018Bamrev primerekkel pJKI670-ről PCR-rel amplifikált fragmentet *EcoRI* és *BamHI* hasítással klónoztuk pJKI88/*EcoRI*, *BamHI* vektorba. A pGMY12 klónozása hasonló módon történt: az S013Ecofor és S014-S015noncodeBamrev primerekkel pJKI670-ről készült amplikont *EcoRI* és *BamHI* hasítással klónoztuk pJKI88 vektorba megfelelő helyére. A pGMY14, pGMY15 és pGMY20 plazmidokat a pJKI670-ben generált *PstI*, *AccI* ill. *BsaBI* hasítással képzett deléció eredményezte. A pGMY23-hoz PCR-rel készítettünk egy amplikont (primerek: S003BXhrev és S014-S015noncodeBamrev, templát: pJKI670), amelyet *BamHI* hasítással klónoztunk pJKI88 vektor *BamHI* helyére. A pGMY15 plazmid *PasI* és *BamHI* hasítása után Klenow-fragmenttel és 1  $\mu$ mol dNTP hozzáadásával töltöttük fel a végeket, majd a tompa végek ligálása után kaptuk a pGMY28 plazmidot. A pGMY29-ben a pGMY23 *MfeI*-*KpnI* fragmentjét helyettesítettük a pGMY28 *MfeI*-*KpnI* fragmentjével. A pGMY32 a pGMY29-ből származott *SbfI*-*KpnI*-gyel hasítás, majd Klenow-fragmenttel és 1  $\mu$ mol dNTP hozzáadásával feltöltés, majd ligálás révén. A pGMY33 a pJKI670 *PstI* fragmentjének pJKI88 *PstI* helyére klónozásával készült, a megfelelő orientációt restriktációs hasítással ellenőriztük. A pGMY34 esetében a pGMY12-ben a P<sub>S004</sub> szekvenciát cseréltük ki az eredeti SGI1-C templátból PCR-rel amplifikált P<sub>S012</sub> szekvenciára (primerek: S013Ecofor és d012seqrev, templát: SGI1-C gDNS). Az amplikont és a pGMY12 plazmidot *EcoRI* és *PacI* enzimekkel hasítottuk, a P<sub>S012</sub>-öt tartalmazó DNS szakaszt klónoztuk a pGMY12/*EcoRI*, *PacI* helyére. A pGMY33 *EcoRI*-*MfeI* helyére a pGMY34 *EcoRI*-*MfeI* fragmentjét klónoztuk, ami a pGMY38-at eredményezte. A pGMY39-hez a DR szekvenciát mutagenizáltuk: a S013\_DRmod és d012seqrev primerekkel (templát: pGMY38) létrehozott

amplikont *EcoRI* és *PacI* enzimekkel hasítottuk és pGMY38 *EcoRI-PacI* helyére klónoztuk. A pGMY40 hasonló módon készült: az AcaCD kötőhelyet mutagenizáltuk, az S013\_flhDCmod és d012seqrev primerekkel (templát: pGMY38) létrehozott amplikont szintén *EcoRI* és *PacI* enzimekkel hasítottuk és pGMY38 *EcoRI-PacI* helyére klónoztunk. A pGMY41 a pGMY38 *HincII*- helyére *XhoI*-linker szekvencia (8 bp) beligálásával készült, ami az S013 *frameshift* mutációját okozza. A pGMY42 hasonlóan, a pGMY38 *BsaAI* helyére történt *XhoI*-linker ligálásával készült, ami a S014 *frameshift* mutációját okozza. A pGMY43 elkészítéséhez a pGMY38 *EcoRI-BamHI* helyére klónoztuk a S013DREco-S018Bamrev primer párral amplifikált (templát: SGI1-C gDNS) *EcoRI*-gyel és *BamHI*-gyel hasított fragmentet. A pGMY44 elkészítéséhez a pGMY38-ban deléciót generáltunk *HincII-BsaAI* hasítással és a tompa végek ligálásával. A pGMY38-at *PacI-HincII*-vel hasítottuk, a *PacI* helyet a NEBNext® End Repair kit gyártó által javasolt alkalmazásával feltöltöttük, majd ligáltuk, amely a pGMY47-et eredményezte. A pGMY49 elkészítéséhez a pGMY38 *AflIII* helyét töltöttük fel Klenow-fagment és 1 μmol dNTP hozzáadásával, majd a tompa végeket ligáltuk. A pGMY50 létrehozásához a pGMY44-ben generáltunk deléciót a *BglIII* hasítással és a feltöltött tompa végeket ligáltuk, ezáltal nem maradt *BglIII* hely a szekvenciában. A pGMY51 létrehozásához a pGMY44-et *BglIII-BsaBI*-gyel hasítottuk a *BglIII* ragadós végét Klenow-fagment és 1 μmol dNTP hozzáadásával feltöltöttük, majd a tompa végeket ligáltuk. A pGMY44 *EcoRV-BsaBI* hasítása után a tompa végeket ligáltuk, amellyel a pGMY52-öt hoztuk létre.

#### Melléklet 4: 10. táblázat Primerek listája

Név	Szekvencia
pUCfor21	caggggtttccagtcacgac
cateco	cagctcaccgtctttcattgc
catfor	AAATCACTGGATATAACCACCGTTG
cat3.2	ATGAATTcCAACAGTACTGCGATGAGTGGC
cat5	GTATCAACAGGGACACCAGGAtta
RJ2	agctgcagcggcCGCTCGAAGAGGTAGAGCAG
RJ4	ctttatgtgtttgtgattgtaag
LJ2	agctgcagcggccgcaagttttactctgtctccag
attsgilfor	gctctagagcggccgcATGGAAGGCGGCTTCCTGGC
attsgilrev	gctctagagcggccgcAAATGTGAATCGAATCACAATCG
sgilseq1rev	aactgcagtggttggtatactcagc
pxisdelfor1	caccagtattgatagacctgatttatgagagacagctaccaatcctCATATGAATATCCTCCTTAGTTC
pxisdelfor2	caatcctcggctctgctgctgccccttttagggcgcgacaagttatCATATGAATATCCTCCTTAGTTC
pxisdelrev	gcggaattctgatgatgtccagccccaccgattccataccgaattgaGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
S003for2	gaacatggttcaactataggtatc
003delfor	tgcaaaacaataacataaaaaaacggcacattggccggttattaagCATATGAATATCCTCCTTAGTTC
004delfor	ctgatactgagcaagtagttggctaaatggcttcattacttaccctgCATATGAATATCCTCCTTAGTTC
004delrev	gtcgaataaatcgctagtgcccaaataggcactccagaggccatgGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
005delrev	agcgaacatgtgttgatgccattctgccgggtctcaaaagctgcctgaGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
006delfor	aattagcatcgctatttgcccttttgcgcatacgcgcatgtattcaCATATGAATATCCTCCTTAGTTC
007delrev	tagtttcaatcaatctggccgcagaaaaaaggtaaggaggactactgaGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
012delrev	gggttaataaaacttttaaaatcataagttgtactgacgtgacaaaGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
013delfor	gcaaatgagtacaaaccgaactcccaactgtccaatttgggcagtcCATATGAATATCCTCCTTAGTTC
018delrev	accgtcctggagagcctccgcgccccaaaaaacaccggctctgctgattaaGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
023delfor	gccttttggcggtgtttgtagtctcaactaacttactatcggtcaCATATGAATATCCTCCTTAGTTC
026delrev	tttataatcatgtaggggtggtgagtgtacaaaattctagaggggattaaGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
027delrev	atacatgttataaatactgtataaaattctatgttaaaaaaacgtacatgGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
044delfor	atgaactgttaagaaaatggtggtttgtgaacaagaaaaaaaagctcgGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
minidelrev	acttaccatcacaaaaacataaagtattgattatgaagatattactCATATGAATATCCTCCTTAGTTC
d003seqrev	gtgatgaggtgactgcctac
d004seqfor	tcattggcgaggggtgcatcg
d005seqrev	gtatcacgctatccgtaaagaag
d006seqfor	ttcctgattaccgcataagaatg
d007seqrev	gtcgttaaggcaatcggaacattg
d012seqrev	gtttaacgctctggacatctctg
d013seqfor	gaatagtctatccatctcgactg
S019rev2	TGGAATTcGGTCATGGTCGCATCGATG
S020for1	tactcatcctgcaggcttttaaac
S020for2	aactgcagtcgatacataaaatccctc
S020for3	aactgcagaatcgaagccttatttagtag
S022promfor	cactgcagtgcaagcacaatgatgataaacatc
sgi1S025rev	aaGGATCCtctgtctacggtgttactttcaac
sgi1S026for	aaGTGCACctctttatacaatcgtcctag
d026seqrev	cttgggtggcggaagccaaag
d027seqrev	aagtcctccctgcgtccgctg
d043seqrev	ggacggtttgtttcgttgac
d044seqfor	cacctcgcttgggtgcacac
S013Ecofor	ttgaattctgtcggcaactttgtcacgtc
S014-S015noncodeBamrev	tgtggatccaacggccctgttatctatgctgaataattc
S018Bamrev	taggatccatctacgctatgtcatattcctaataagac
d012seqrev	gtttaacgctctggacatctctg
S013_DRmod	cttcacatgtaaacgccttctcagataatgtcggcaactttgtcacgtcag
S013DR_Eco	gcgaattcagtcacaataaaacttcacatg
S013_flhDCmod	cttcacatgtgaaagtttttttgactCTCGAGCGGATATCGGCCTTTCCttcggtttgtactattgtcgg

## ADATLAP

### a doktori értekezés nyilvánosságra hozatalához\*

#### I. A doktori értekezés adatai

A szerző neve: Murányi Gábor

MTMT-azonosító: 10054393

A doktori értekezés címe és alcíme: A Salmonella Genomic Island 1 és az IncA/C plazmidok molekuláris kapcsolatainak vizsgálata *E. coli* modellrendszerben

DOI-azonosító: 10.15476/ELTE.2020.083

A doktori iskola neve: Biológia Doktori Iskola

A doktori iskolán belüli doktori program neve: Klasszikus és Molekuláris Genetika Doktori Program

A témavezető neve és tudományos fokozata: Dr. Kiss János, PhD

A témavezető munkahelye: Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóintézet, Gödöllő

#### II. Nyilatkozatok

##### 1. A doktori értekezés szerzőjeként

a) hozzájárulok, hogy a doktori fokozat megszerzését követően a doktori értekezésem és a tézisek nyilvánosságra kerüljenek az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban. Felhatalmazom a Természettudományi kar Dékáni Hivatal Doktori, Habilitációs és Nemzetközi Ügyek Csoportjának ügyintézőjét, hogy az értekezést és a téziseket feltöltse az ELTE Digitális Intézményi Tudástárba, és ennek során kitöltse a feltöltéshez szükséges nyilatkozatokat.

##### 2. A doktori értekezés szerzőjeként kijelentem, hogy

a) az ELTE Digitális Intézményi Tudástárba feltöltendő doktori értekezés és a tézisek saját eredeti, önálló szellemi munkám és legjobb tudomásom szerint nem sértem vele senki szerzői jogait;

b) a doktori értekezés és a tézisek nyomtatott változatai és az elektronikus adathordozón benyújtott tartalmak (szöveg és ábrák) mindenben megegyeznek.

3. A doktori értekezés szerzőjeként hozzájárulok a doktori értekezés és a tézisek szövegének plágiumkereső adatbázisba helyezéséhez és plágiumellenőrző vizsgálatok lefuttatásához.

Kelt: Budapest, 2020. június 29.

.....  
.....

a doktori értekezés szerzőjének aláírása

\*ELTE SZMSZ SZMR 12. sz. melléklet